

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Leiter: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Raimund Harndt)
der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des
Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

**POLYCLONALE B-LYMPHOZYTENSTIMULATION MIT
AUTOLOGEN UND HOMOLOGEN ANTIGENEN SOWIE
KÜNSTLICHEM MITOGEN BEI PATIENTEN MIT
PARODONTITIS MARGINALIS PROFUNDA**

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde am
Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Wolfgang Kopp
aus Herborn

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546618_0034

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Leiter: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Raimund Harndt)
der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
des Fachbereiches für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

POLYCLONALE B- LYMPHOZYTENSTIMULATION MIT
AUTOLOGEN UND HOMOLOGEN ANTIGENEN SOWIE
KÜNSTLICHEM MITOGEN BEI PATIENTEN MIT
PARODONTITIS MARGINALIS PROFUNDA

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Wolfgang Kopp
aus Herborn

Referent: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Raimund Harndt

Korreferenten: Professor Dr. med. dent. Hans Lenz

Professor Dr. med. Hartmut Rühl

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30.8.1983

Die Geburt ist nicht ein augenblickliches Ereignis, sondern ein dauernder Vorgang. Das Ziel des Lebens ist es, ganz geboren zu werden; und seine Tragödie, daß die meisten von uns sterben, bevor sie ganz geboren sind. Zu leben bedeutet, jede Minute geboren zu werden. Der Tod tritt ein, wenn die Geburt aufhört.

Erich Fromm

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	9
1.1 Allgemeine Einführung	9
1.2 Fragestellung	11
2. ALLGEMEINER TEIL	12
2.1 Prinzip der Plaquettechnik	12
2.2 Indirekte Plaquettechnik	13
2.3 Passive hämolytische Plaquettechnik	13
3. SPEZIELLER TEIL	14
3.1 Kupplungsmethoden des passiven hämolytischen Plaque-Assays	14
3.1.1 Chemische Kupplungsmethode	14
3.1.2 Immunologische Kupplungsmethode	15
3.1.3 Allgemeine Bewertung der passiven Plaquettechnik	15
4. IMMUNOLOGIE DER ENTZÜNDLICHEN PARODONTOPATHIEN	17
4.1 Immunologischer Mechanismus	17
4.2 Literaturübersicht	19
5. MATERIAL UND METHODE	26
5.1 Material	26
5.2 Kriterien der Patientenauswahl	28
5.3 Antigenpräparation	29
5.3.1 Zahnplaque-Entnahme und Präparation	29
5.3.2 Isolierung und Kultivierung von Humanfibroblasten	30
5.3.3 Desintegration von Humanfibroblasten	33
5.3.4 Proteinbestimmung	33
5.4 Zellpräparation	34
5.4.1 Lymphozytenisolierung	34

5.5	Methode des Protein-A Plaque-Assays	35
5.5.1	Lymphozytenkultivierung	35
5.5.2	Beschichten der Erythrozytenmembran	37
5.5.3	Herstellen der Isogevers-Verdünnungslösung	38
5.5.4	Komplementpräparation	39
5.5.6	Herstellung des Grund- und Fixationsagars	39
5.5.7	Plaquesansatz	40
5.6	Statistik	42
6.	ERGEBNISSE	43
6.1	Kinetik der Fibroblastendesintegration	43
6.2	Quantitative Bestimmung von Fibroblastenprotein	44
6.3	Proliferative Transformation peripherer Lymphozyten auf antigene und mitogene Stimulation	45
6.4	Vergleich der spontanen Plaquebildung zwischen Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und Normalpersonen	47
6.5	Polyclonale B-Lymphozytenstimulation mit desintegrierter, autologer Zahnplaque	49
6.6	Polyclonale B-Lymphozytenstimulation mit homologem Fibroblastenprotein	50
6.7	Pokeweed-Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation	51
6.8	Antigen- und mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation aller Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und Normalpersonen im Vergleich	53
6.8.1	Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen Pokeweed-Mitogen und autologer Zahnplaque bei Patienten und Normalpersonen	54
6.8.2	Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen Pokeweed-Mitogen und zytoplasmatischem Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen	55

6.8.3	Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen autologer Zahnplaque und zytoplasmatischem Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen	55
7.	DISKUSSION	57
7.1	Allgemeine Vorbemerkung	57
7.2	Pokeweed-Mitogen-induzierte polyclonale Lymphozytenstimulation bei Patienten und Normalpersonen	58
7.3	Polyclonale B-Lymphozytenstimulation auf autologe Zahnplaque-Antigene bei Patienten und Normalpersonen	60
7.4	Polyclonale B-Lymphozytenstimulation auf zytoplasmatisches Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen	64
7.5	Zusammenfassende Diskussion	68
8.	ZUSAMMENFASSUNG	70
9.	LITERATURVERZEICHNIS	71
10.	ANHANG	90

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einführung

Die Grundlage der Abwehrfunktionen, die dem menschlichen Organismus für die Abwehr schädigender Einwirkungen zur Verfügung stehen, sind das spezifische und unspezifische Abwehrsystem. Beide werden jeweils durch das zelluläre und humorale Immunsystem repräsentiert.

Die unspezifische Abwehr besitzt die Fähigkeit, ohne primären Kontakt mit dem schädigenden Agens, den Fremdkörper unschädlich zu machen. Das spezifische System bedarf hingegen einer vorausgegangenen Auseinandersetzung, um seine immunologische Potenz zu entfalten.

Diese Potenz ist dann pathologisch, wenn sie sich gegen den eigenen Organismus wendet. Die immunologische Reaktion unterliegt der Regulation. Sie kann als Prozeß definiert werden, der nicht nur die Größe, die Dauer, die Intensität, sondern auch das Tempo der immunologischen Antwort bestimmt. Die regulatorischen Mechanismen, der sich das System bedient, wurden von GUPTA und GOOD (1981) (26) zusammengefaßt als:

- regulatorische Rückkopplung der Antikörperproduktion

- Bereitstellung von antiidiotypischen Antikörpern

- Bildung von Effektormolekülen durch T-Lymphozyten

- direkte Interaktionen zwischen T- und T- sowie T- und B-Lymphozyten

- makrophagische Interaktionen mit B- und T-Zellen

Spezielles Interesse richtete man auf die Rolle der B- und T-Zell-Funktion. Durch künstliche in vitro-Stimulation mittels eines Mitogens versuchte man, genaue Aufschlüsse

über Zellteilung, zytotoxische Aktivität, Mediatorenfreisetzung und Helfer- oder Suppressorfunktion zu erhalten.

Mit Beginn der labortechnischen Entwicklung und deren medizinische Verwertbarkeit konnten klinische Bedingungen besser reproduziert werden. Daher richtete sich die Forschung mehr auf enzymatische und zytotoxische Mechanismen der Plaque aus (LÖE und SILNESS, 1963; SILNESS und LÖE, 1964; LÖE et al., 1965; LÖE und HOLM-PEDERSEN, 1965) (56, 93, 58, 57).

Die Reproduzierbarkeit der Testmethoden weckte das Interesse der Parodontologen, zelluläre, zellvermittelnde und humorale Mechanismen zu untersuchen. Man versuchte, eine kausale Verbindung zwischen der Plaque, dem Stoffwechsel dieser und deren immunologischer Wirkung herzustellen (NISENGARD, 1977) (72).

Spezielles Augenmerk richtete man auf das Verhalten von Granulozyten und Lymphozyten. Lymphozyten sollen plaquebedingt eine Sensibilisierung und damit Proliferierung erfahren, um sich dann gegen Bakterien, deren Fragmente und zytotoxische Metaboliten zu richten (BRANDZAEG, 1965; MERGENHAGEN et al., 1970; IVANYI und LEHNER, 1970, 1971; HORTON et al., 1973) (6, 67, 35, 36, 30).

Histologische Untersuchungen menschlicher Gingiva haben ein vermehrtes Vorhandensein von Lymphozyten und Plasmazellen in Abhängigkeit der parodontalen Schädigung aufgezeigt (WITTWER et al., 1969) (102). Ferner haben immunologische Untersuchungen von Lymphozyten im entzündlichen Gingivagewebe bestätigt, daß im Anfangsstadium der Entzündung vorwiegend T-Lymphozyten, aber auch B-Lymphozyten zu differenzieren sind (MACKLER et al., 1974) (61). Bei Fortschreiten der Entzündung, so konnten die Autoren nachweisen, findet eine Assoziation mit Immunglobulin G (IgG) vorwiegend der IgG₁- und

IgG₃-Subklassen statt, die an den Fc-Rezeptor der T-Lymphozyten gebunden sind. Damit erfahren sie eine Umwandlung zu aktivierten und reaktiven Zellen (MACKLER et al., 1978, 1978) (62, 63).

Diese antigen-wirksamen Zellen können B-Lymphozyten zur Sekretion von Lymphokinen stimulieren, indem sie sich an die C₃-Rezeptoren der B-Zellmembran binden. So läßt die Beobachtung den Schluß zu, daß auch B-Zellen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der parodontalen Schädigung spielen.

1.2 Fragestellung

Es wird davon ausgegangen, daß der parodontalen Destruktion bei Patienten mit Parodontitis marginalis profunda auch eine immunpathologische Komponente zugrunde liegt.

Es soll daher mit einer objektivierbaren und reproduzierbaren Testmethode geprüft werden, ob eine Aktivierbarkeit bzw. Stimulation peripherer Lymphozyten gegenüber

- a. autologer Zahnplaque
- b. zytoplasmatischen Bestandteilen homologer Fibroblasten
- c. T- und B-Zell abhängigem Pokeweed-Mitogen (PWM)
als Referenzstimulans

vorliegt.

Zur experimentellen Lösung dieser Frage wurde der umgekehrte hämolytische Plaque Assay (Protein-A Plaque-Assay) herangezogen.



2. ALLGEMEINER TEIL

2.1 Prinzip der Plaqueteknik

Die Plaqueteknik hat sich seit 1963, als sie von JERNE und NORDIN vorgestellt wurde, einer rasanten Entwicklung unterzogen (JERNE und NORDIN, 1963; JERNE et al., 1966; JERNE et al., 1974) (39, 40, 41). Sie stellt heute im Bereich der immunologischen Grundlagenforschung die Methode der Wahl dar, Leistungen und Strukturen nicht nur ganzer Zellpopulationen, sondern auch von Einzelzellen in ihrer Abwehrfunktion in vitro und in vivo zu verfolgen. Ferner gestattet sie noch, feinste graduelle Korrelationen zwischen einer pathogenen Ursache und der Ansprechbarkeit des Wirtes zu untersuchen.

Sie findet heute breite Anwendung in der Forschung und experimentellen Medizin mit dem Ziel, antikörperbildende Zellen qualitativ und quantitativ zu beschreiben.

Das Prinzip dieser Technik besteht darin, lymphoide Zellen eines immunisierten Versuchstieres zu gewinnen, in einem Agar bzw. Agarosegel, welches Erythrozyten enthalten kann, mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen zusammenzubringen und zu inkubieren. Während dieser Inkubationszeit sezernieren die Immunozyten Antikörper, die sich an die Erythrozyten anlagern.

Gibt man Komplement hinzu, so lysieren die Erythrozyten, und es entsteht ein in der Durchsicht runder, heller, durchsichtiger Fleck, der sogenannte Lysehof - oder ein Plaque, der mit unbewaffnetem Auge zu erkennen ist. Da die Anzahl der Zellen im Ansatz bekannt ist, stellt die Anzahl der Plaque, der sog. Plaquewert, ein zu interpolierendes Maß für die Aktivierbarkeit bzw. Stimulierbarkeit der Lymphozyten dar, sich in Immunglobulin sezernierende Zellen (ISZ) zu verwan-

deln (MALBERG, 1970; CUNNINGHAM, 1973; DRESSER und GREAVES, 1973) (63, 14, 15).

2.2 Indirekte Plaquemethode

Eine erweiterte Form dieser Technik stellt die indirekte Methode dar.

Ein sogenanntes Entwicklerserum wirkt auf die in der Gelschicht suspendierten Erythrozyten ein. Dieses Antiserum gegen Ig-Antikörper ist nach Zugabe von Komplement für die Lyse der roten Blutkörperchen verantwortlich (INGRAHAM, 1952) (33).

2.3 Passive hämolytische Plaquetechnik

Die heute gebräuchlichste Form stellt die Methode der passiven Plaquetechnik dar. Sie umfaßt all diejenigen Techniken, die als Antigen Haptene, Proteine oder bakterielle Polysaccharide verwenden.

Das Antigen wird dabei direkt an die Erythrozyten gebunden. Die von den sensibilisierten Immunozyten sezernierten Antikörper bilden einen Erythrozyten-Antigen-Antikörperkomplex. Nach Zugabe von Komplement lysieren die Indikatorerythrozyten und es entsteht der charakteristische Plaque (MALBERG und SIEGL, 1980) (65).

3. SPEZIELLER TEIL

3.1 Kupplungsmethoden des passiven hämolytischen Plaque-Assays

Der zur passiven hämolytischen Plaquetechnik erforderliche Erythrozyt-Antigen-Antikörperkomplex kann über zwei verschiedene Kupplungsverfahren synthetisiert werden:

- a. Chemische Bindung von Antigen an die Erythrozytenmembran.
- b. Immunologische Bindung des Antigens an die Erythrozytenmembran.

3.1.1 Chemische Kupplungsmethode

Die chemische Kupplung kann mit ECDI (1-äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCL) als Kupplungsreagens durchgeführt werden, wie sie von GOLUB et al. (1968) und KAPLAN und FREEMAN (1968) beschrieben wurde (24, 43).

Eine einfachere und schonendere Methode stellt die Kupplung über Chromchlorid dar, welche von KISHIMOTO et al. (1968) vorgestellt wurde (47).

Ein im Versuchsfall verwendetes Verfahren, die Bindung über die Chromchloridmethode nach GRONOWICZ et al. (1976), stellt die Methode der Wahl dar (25). Sie gestattet nicht nur die Differenzierung verschiedener Ig-Isotypen, sondern ist in ihrer praktischen Durchführung schnell und einfach zu handhaben.

Der Nachteil aller chemischen Kupplungstechniken liegt in der kurzen Verfügbarkeit der Indikatorerythrozyten. Daher

muß ein schnelles Auszählen der Plaqueansätze gewährleistet sein, da Spontanplaque das Ergebnis verfälscht.

3.1.2 Immunologische Kupplungsmethode

Die immunologische Kupplung verbindet die Schaferythrozyten mit dem Antigen direkt oder indirekt über ein entsprechendes Antigen. Die Sensibilisierung der Schafe erfolgt meist mit Anti-Schaferythrozyten-Antikörper (BARTH und MERCHANT, 1967; SERGE, D. und SERGE, M., 1967) (2, 84).

Der Vorteil dieses Bindungsmechanismus liegt in einer längeren Verwendbarkeit der roten Indikatorzellen.

3.1.3 Allgemeine Bewertung der passiven Plaquetechnik

Die passive Plaquetechnik ist in ihrer Anwendung nicht unkritisch zu bewerten. Das chemische Kupplungsverfahren erfordert viel Erfahrung, wobei Faktoren wie Alter, Erythrozytendichte einschließlich ihrer Oberflächendeterminante sowie Vermeiden der Eigenhämolyse in Testuntersuchungen ermittelt werden müssen.

Eine weitere kritische Größe stellt der Grund- und Trägeragar dar. Grundbedingung seitens des Trägeragars ist das Nichtvorhandensein antikomplementärer Eigenschaften und absolute Neutralität gegenüber den Inkubationsbedingungen sowie chemischen und biochemischen Substanzen. Die Agarose als optimales Medium wurde von BERNEŠKOVÁ et al. (1963) empfohlen (3).

Der schwierigste Schritt in der verwendeten passiven Plaquetechnik stellt das Mischen der Lymphozyten mit warmer Aga-

rose dar. Die Lymphozyten tolerieren diesen Schritt sehr bedingt, so daß eine Wasserbadtemperatur von 31°C unbedingt eingehalten werden muß.

Deshalb ist das Mischen der Lymphzellen mit den Indikatorerythrozyten und der warmen Agarose sowie das Aufbringen und Ausstreichen dieses Sols auf den Grundagar der kritischste Schritt.

Diese Handgriffe können nur durch stereotypes Einüben beherrscht werden. Eine zu dicke Trägerschicht, Risse, Luftblasen oder Zellklumpen müssen unbedingt vermieden werden, da sie die Plaquewerte verfälschen.

Plaques, welche vor dem Komplementzusatz im Agar sichtbar werden, mit oder ohne zentral lokalisierter kernhaltiger Zelle, sind von der Auswertung auszuschließen.

Eine Plaque kann dann als echt bezeichnet werden, wenn sich nach allen laborgerecht durchgeführten Arbeitsschritten ein durchsichtiger Hämolysehof zeigt, mit einer im Zentrum liegenden Plasmazelle.

4. IMMUNOLOGIE DER ENTZÜNDLICHEN PARODONTOPATHIEN

4.1 Immunologischer Mechanismus

Das Vorherrschen von mikrobiell besiedelter und biologisch aktiver Zahnplaque beeinflusst und induziert nicht nur kariöse Destruktionen der Zahnhartsubstanz, sondern trägt zur Störung des bestehenden Gleichgewichtes zwischen An- und Abbau der parodontalen Strukturen bei.

Der einmal in Aktion gesetzte Mechanismus kann folgendermaßen dargestellt werden:

- a. als körperfremd erkannte Substanzen (Endotoxine, bakterielle Zellfragmente, Mukopolysaccharide und Proteine) provozieren im Parodont durch ihre Phlogogenwirkung eine entzündliche Antwort, im Sinne einer unspezifischen Entzündung.
- b. die Antwort des Wirtes liegt in der mikrozytären Mobilisation. Dabei tragen lysosomale Enzyme der neutrophilen Granulozyten zur Initialläsion bei.
- c. Lymphozyten treten nach Antigenerkennung in direkte Wechselwirkung mit den Antigenen.
- d. T-Lymphozyten proliferieren nach Antigenkontakt und produzieren sogenannte Mediatoren:
 1. Mediatoren, die Makrophagen beeinflussen
 - a. Migrationsinhibitionsfaktor
 - b. Makrophagenaktivierender Faktor
 - c. Makrophagenaggregierender Faktor
 - d. Chemotaktischer Faktor für Makrophagen

2. Chemotaktische Faktoren

- a. Chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten
- b. Chemotaktischer Faktor für eosinophile Granulozyten
- c. Chemotaktischer Faktor für Lymphozyten
- d. Chemotaktischer Faktor für Makrophagen

3. Zytotoxische Faktoren: Lymphotoxine

4. Wachstumshemmende Faktoren

- a. Klonaler Inhibitionsfaktor
- b. Proliferations-Inhibitionsfaktor

5. Hautreaktiver Faktor

6. Mitogene Faktoren für Lymphozyten

7. Interferon nach RESCH, 1976 (82)

e. B-Lymphozyten proliferieren nach Erkennen des Antigens und sezernieren als Immunantwort Immunglobuline in die Stromaflüssigkeit. Der Antigen-Antikörperkomplex kann das Komplementsystem aktivieren, welches an der parodontalen Schädigung beteiligt sein kann. Die Sezernierung von Immunglobulin erfolgt nur nach Differenzierung zu einer Plasmazelle.

f. das Auftreten von

- | | |
|----------------|--|
| Histamin, | durch Degranulation von Gewebsmastzellen freigesetzt |
| Serotonin, | aus dem Zytoplasma chromaffiner Zellen und Trombozyten |
| Bradikinin, | aus der im Plasma vorliegenden Vorstufe Kinogen |
| Prostaglandin, | aus dem mikrosomalen Enzymsystem von Gewebszellen |

trägt zur Vasodilatation und Gefäßpermeabilitätssteigerung des kapillären Systems bei. Dadurch wird die Entzündungsbereitschaft gesteigert und werden bestehende Prozesse unterhalten.

4.2 Literaturübersicht

Die Rolle der Zahnplaque für die gingivale Entzündung wurde von LÖE und SILNESS (1963), SILNESS und LÖE (1964), LÖE und HOLM-PETERSEN (1965), LÖE et al. (1965), MERGENHAGEN und SNYDERMAN (1971), PAYNE et al. (1975) und KAHNBERG et al. (1976) beschrieben (56, 93, 57, 58, 68, 78, 42).

LOCKWOOD und ALLISON untersuchten 1963 die aktive Phagozytose von weißen, kleinzelligen Blutkörperchen (PMN) und die Rolle der lysosomalen Enzyme bezüglich der geschädigten parodontalen Struktur (55).

Sie konnten wie TAICHMAN et al. (1966) und ISHIKAWA et al. (1972) bestätigen, daß der Verlust des Attachments bei chronischer Entzündung des Parodontiums durch die lysosomalen Enzyme verursacht wird (96, 34).

Ähnliche Untersuchungen wurden von TEMPEL et al. (1970), LINDHE und HELLDEN (1972), PAGE et al. (1973) und PAYNE et al. (1975) angestellt (97, 54, 74, 78).

PAGE et al. (1972) konnten nachweisen, daß lysosomale Enzyme selektiv von Makrophagen sezerniert werden und das Komplementsystem aktivieren können (73). In diesem Sinne äußerten sich auch ALLISON et al. (1976). Sie stellten eine Hypothese vor, die der dentalen Plaque und dem Bakterium *Actinomyces viscosus* die Fähigkeit zur Makrophagenaktivierung zuschreibt. Die freiwerdenden hydrolytischen Enzymsysteme

zeichnen auch verantwortlich für die Degeneration von Fibroblasten (1).

Eine zellgebundene Destruktion, speziell der Fibroblastenpopulation, ist von HORWITZ (1977) beschrieben worden. Nach seiner Auffassung sind die lysosomalen Enzyme für die Änderung der "Antigenität" der Gewebsfibroblasten verantwortlich (32).

LUCAS et al. (1979) untersuchten die Wechselwirkung zwischen L-Fibroblasten und Endotoxin. Nach Auffassung der Autoren können Endotoxine den Messenger-RNA-Transport zu den zytoplasmatischen Ribosomen unterdrücken, wobei aber die in vitro-Konzentrationen wesentlich höher liegen als in vivo möglich. Eine Übertragung auf die parodontale Destruktion erscheint den Verfassern zweifelhaft (59).

MERGENHAGEN et al. (1970) sehen in der Antigen-Antikörper-Reaktion die Ursache für eine Aktivierung des Komplementsystems, welches chemotaktische Faktoren freisetzt und wichtige Mediatoreneigenschaften im Entzündungsgeschehen besitzt (67).

SNYDERMAN (1973) postulierte eine Immunkomplexformation, die beständig in chronisch entzündlichen Destruktionen zu finden ist und keine lokale, sondern generelle Abwehrfunktion aufweist (95).

Diskret wurde dieser theoretische Ansatz schon von KNOX (1970) vermutet. Er untersuchte die Antigenität von Zahnplaque und deren Mikroorganismen. Spezifiziert wurden diese antigenen Strukturen von KNOX und WICKEN (1973) sowie WICKEN und KNOX (1975) als Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer und Lipoteichoinsäure gram-positiver Bakterien (48, 49, 101).

Die Rolle der Immunglobuline IgG, IgM, IgA in der Gingivaflüssigkeit sind von BRILL und BRÖNNESTAM (1960), BRANDTZAEG (1965) und im gingivalen Gewebe von THONARD et al. (1966), GENCO et al. (1974), BRANDTZAEG und KRAUS (1967) beschrieben worden. Eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Mikroorganismus wurde nicht dargestellt (8, 6, 98, 21, 7).

Erst MARTTALA et al. (1974), NISENGARD und JARETT (1976) konnten an lyophilisierten Bakterien eine spezifische Zuordnung zu IgG, IgM, IgA, IgE und dem C₃-Faktor mit Hilfe der Fluoreszenztechnik nachweisen (66, 71).

Die Diskussion zellulärer Aspekte der spezifischen Immunität, die Rolle von T- und B-Lymphozyten, wurden von IVANYI und LEHNER (1970) eröffnet und mit Nachuntersuchungen 1971, 1972, 1974 fortgesetzt (35, 36, 37, 38).

Die Rolle der T- und B-Zellen bei chronischen, parodontitischen Entzündungsprozessen wurden von KIGER et al. (1974), HORTON et al. (1974), IVANYI und LEHNER (1972, 1974), CHESSE et al. (1974), LANG und SMITH (1976, 1977), PATTERS et al. (1976, 1977), GINSBURG et al. (1978), SEYMOUR (1978) und SEYMOUR et al. (1979) nachgewiesen, indem sie durch Antigenstimulierung eine Lymphozytentransformation erzielten (45, 31, 37, 38, 11, 51, 52, 76, 77, 22, 85, 89).

CARDELLA und ALLISON (1974) konnten beweisen, daß die "B-Zell dominante Läsion" keinerlei Kontrollmechanismen unterliegt. Daraus postulierten PAGE und SCHROEDER (1976), daß die persistierende, unkontrollierte Produktion von B-Zell-Lymphokinen, Prostaglandinen und hydrolytischen Enzymen verantwortlich für die Gewebszerstörung ist (10, 75).

Eine Lymphozytentransformation durch Antigenkontakt ist unter in vitro-Bedingungen nicht gleichbedeutend mit einer T- und B-Zelltransformation in vivo.

Dies konnten CHESSE et al. (1974) nachweisen. Nach ihren Untersuchungen sind mitogene Faktoren Stimulantien, welche von stimulierten T-Zellen abgegeben bzw. freigesetzt werden und B-Zellen unspezifisch zur Proliferation zwingen. In diesem Sinne äußerte sich ebenfalls FAUCI et al. (1976) (11, 18).

Damit haben die Autoren die Abhängigkeit der B- von der T-Zellstimulation - und umgekehrt - nachgewiesen. CHESSE et al. (1974) konnten in der gleichen Untersuchung berichten, daß B-Zellen die vierfache Menge an "migration inhibition factor" (MIF) sezernieren wie die vergleichbare Anzahl von stimulierten T-Zellen (11).

GIRARD et al. (1977) sowie CHURCH und DOLBY (1978) konnten aufzeigen, daß die Transformation der Lymphzellen durch Faktoren wie Alter des Patienten (GIRARD) sowie Präparation, Konzentration und Art des Antigens (CHURCH und DOLBY) beeinflußt wird (23,12).

Einen wesentlichen Beitrag zur differenzierten Erfassung lymphozytärer Zellen sowie eine phänotypische Charakterisierung werden von SEYMOUR (1978), SEYMOUR et al. (1978), SEYMOUR und GREAVES (1979, 1980) und SEYMOUR et GREENSPAN (1979) vorgenommen (85,86,87,90,88).

SEYMOUR stellte 1978 ein theoretisches, histopathologisches Modell immunologischer Prozesse in chronisch entzündlichen Parodontaldestruktionen vor (85). Die chronisch entzündliche Läsion wird in drei lokalisierte Zonen aufgeteilt, die durch eine "phänotypische Zellpopulation" gekennzeichnet ist.

Die oberste Zone, die Zone der "natürlichen Immunität", enthält neben geschädigten und nichtgeschädigten Makropha-

gen, lysosomale Enzyme, Lipopolysaccharide, polymorphkernige Leukozyten sowie C₃-Fragmente des "alternativ pathway".

Die mittlere Zone, die Zone der "mitogenesis" ist charakterisiert durch stimulierte B-Zellen, welche mit T-Helferzellen kooperieren, blastogene T-Lymphozyten, Lymphokine sowie geschädigte und nichtgeschädigte Makrophagen. In dieser Zone werden T-Zell-Oberflächenantigene, da sie positiv für IgM und IgG reagieren, an das Fc-Fragment bzw. Rezeptor gebunden. (85,87,88).

Die vorhandenen T-Zellen funktionieren lediglich als Helfer-Zellen, die mit Makrophagen kooperieren und B-Zellen unspezifisch zur Proliferation zwingen (SEYMOUR et al., 1979) (89).

Die dritte Zone, die "effector cell zone", kann als Zone der Destruktion umschrieben werden. In ihr finden sich geschädigte Strukturen wie auch das schädigende Agens selbst.

Nach Angaben der Autoren sind diese "Agenzien":

- a.) Killerzellen, die Fibroblasten zerstören
- b.) Osteoklastisch aktivierender Faktor (OAF), welcher für die Resorption verantwortlich ist
- c.) zytotoxische T-Zellen, welche die Antigenität von Fibroblasten stimulieren
- d.) ein "fibroblast activating factor" (FAF), der die Lyse der Fibroblasten betreibt
- e.) Plasmazellen, die den OAF stimulieren und Antikörper für den Antigen-Antikörperkomplex sezernieren

Die Transformation von B-Lymphozyten in Immunglobulin sezernierende Plasmazellen wurde entweder durch visuelles Betrachten, durch Nachweis immunfluoreszierender Techniken oder über einen radioimmunologischen Niederschlag nachgewiesen (LYF et al., 1973; WALDMAN et al., 1974; WALDMAN et al., 1976; BROOM et al., 1976 und SIEGAL et al., 1976) (60, 99, 100, 9, 92).

FAUCI et PRATT (1976, 1976) und FAUCI et al. (1976) beschrieben einen direkten Plaque-Assay in Anlehnung an die Technik von JERNE und JORDIN (1963) und JERNE et al. (1966) für das humane lymphozytäre System (17, 19, 18, 39, 40).

Die im Untersuchungsfall angewandte Technik des umgekehrten hämolytischen Plaque-Assays wurde auch von EBY et al. (1975), GRONOWICZ et al. (1976), GINSBURG et al. (1978) und KIRCHNER et al. (1979) beschrieben, wobei EBY et al. spezielle Antikörper sowie Protein-A vom *Staphylococcus aureus* für die Immunglobulinbindung des Fc-Fragments an den Erythrozyten benutzten. Diese Technik erlaubt die Gesamtzahl der Immunglobulin sezernierenden Zellen einer Lymphozytenpopulation zu bestimmen (16, 25, 22, 46).

SIEBER et al. (1980) griffen diese Methode auf und untersuchten die Charakteristika des unspezifischen Pokeweed-Mitogens und anderer Mitogene bezüglich der Dosis-Antwort-Beziehung und Kinetik. Spezielles Augenmerk richteten sie auf die B-Zell-Aktivierung und auf die Reproduzierbarkeit des umgekehrten hämolytischen Plaque-Assays (91).

Diese Untersuchungsergebnisse fanden in den eigenen Untersuchungen praktische Anwendung hinsichtlich Auswahl des Mitogens, dessen Konzentration und den allgemeinen Kulturbedingungen.

Die in vitro-Zerstörung von Zahnplaque wurde von IVANYI und LEHNER (1971), IVANYI et al. (1972), HORTON et al. (1972), REED et al. (1976), PATTERS et al. (1976) und SMITH et al. (1979) beschrieben (36, 37, 29, 81, 76, 94).

REED et al. (1976) untersuchten die effektive Ultraschall-Desintegrationszeit von *Veillonella alcalescens*, *Actinomyces viscosus* und *A. naeslundii* und bestimmten Protein- und Methylpentosegehalt verschiedener desintegrierter Bakterien (81).

Diese Untersuchungen fanden ebenfalls Eingang in eigene Desintegrationsbehandlungen.

5. MATERIAL UND METHODE

5.1 Materialien

--- Liquemin Na-Heparin	(Hoffmann-La Roche, Grenzack-Wyhlen)
--- Ficoll-Paque	(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala)
--- Fetal Calf Serum lyophilisiert	(Gibco Europe, Glasgow)
--- Hammelerythrozyten	(Veterinärmedizinische Mikrobiologie der FU Ber- lin)
--- Penicillin/Streptomycin Kombinationspräparat	(Gibco Europe, Glasgow)
--- L-Glutamin	(Seromed, München)
--- Pokeweed-Mitogen	(Gibco Europe, Glasgow)
--- Rabbit Anti-Sheep Hemolysin	(Gibco Europe, Glasgow)
--- Meerschweinchenkomplement lyophilisiert	(Behring Werke, Marburg)
--- Dako-Serum	(Boehringer Werke, Ingelheim)
--- Blue Cap Zentrifugations- tuben	(Falcon, Cockeysville, USA)
--- PPN-Zentrifugations- röhrchen	(Greiner Labortechnik, Nürtingen)
--- Falcon Kulturröhrchen 16 x 125	(Falcon, Cockeysville, USA)
--- Reaktionsminitubes	(Eppendorf, Hamburg)
--- Gewebeskulturschalen 60 x 15	(Falcon, Cockeysville, USA)
--- Serologische Pipetten 1:1; 1:10; 1:100	(Falcon, Cockeysville, USA)
--- Standardtips	(Eppendorf, Hamburg)
--- Kühlzentrifuge	(Heraeus Christ GmbH, Osterode im Harz)

--- Begasbarer Brutschrank	(Heraeus GmbH, Hanau)
--- Laminar Air Flow	(Dieter Bosch, Radolfzell)
--- MSE 60 W Desintegrator	(Measuring and Science Equipment LTD, London)
--- Agarose EEO high	(Serva, Heidelberg)
--- Gelatine, reinst	(Serva, Heidelberg)
--- Standard Human Serum	(Behring Werke, Marburg)
--- Bio-Rad / Biuret Reagenzien	(Bio-Rad Laboratories, München)
--- HANKS BSS 1 x konz. ohne Phenol rot	(Gibco Europe, Glasgow)
--- HANKS BSS 10 x konz. ohne Phenol rot	(Gibco Europe, Glasgow)
--- HAM'S F 12 ohne Glutamin	(Seromed, München)
--- C M F Puffer	(Boehringer Werke, Mannheim)
--- Trypsin 0,04%	(Boehringer Werke, Mannheim)
--- RPMI-Medium 1640 ohne Glutamin, 1 x konz.	(Seromed, München)
--- Protein-A	(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala)
--- Indubiose Agar A 37	(L'industrie Biologique Francaise, Clichy)
--- Isogevers-Puffer	(eigene Herstellung)
--- Chrom (III) chlorid	(Merck, Darmstadt)
--- Magnesium (III) chlorid	(Merck, Darmstadt)
--- Kalzium (III) chlorid	(Merck, Darmstadt)
--- Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
--- Natriumbarbital	(Merck, Darmstadt)
--- HCl 5n	(Merck, Darmstadt)
--- Sterile Kochsalzlösung isotonisch	(Braun Melsungen AG, Melsungen)

- Spektralphotometer PM 6 (Zeiss Werke, Oberkochen)
- Spektralphotometer PMQ 2 (Zeiss Werke, Oberkochen)
- Leitz Phasenkontrast-
mikroskop mit Orthoplan (Ernst Leitz GmbH,
Wetzlar)
- Mikroskopkamera Orthomat (Ernst Leitz GmbH,
vollautomatisch Wetzlar)
- Phaco Mikroskopobjektive (Ernst Leitz GmbH,
Wetzlar)
- Coulter Counter (Coulter Counter Electro-
nics LTD, Dunstable, Bed-
fordshire England)
- Zaponin (Coulter Counter Electro-
nics LTD, Dunstable, Bed-
fordshire, England)
- Zusammensetzung des VBS-Puffers:
41,4 g NaCl
5,095 g Natriumbarbital
ad 1 Liter Aqua bidest.
mit 5 n HCl auf pH 7,5 einstellen

5.2 Kriterien der Patientenauswahl

Zur Untersuchung wurden zehn Patienten ausgesucht, die an einer Parodontitis marginalis profunda erkrankt waren.

Das Durchschnittsalter der fünf männlichen Probanden betrug 37 Jahre, das der fünf weiblichen 35,6 Jahre. Außer an der Parodontitis marginalis profunda litten diese Patienten an keiner anderen Erkrankung, ausgenommen Patientin Nr. 10 (Diabetes mellitus).

Die aus fünf männlichen Spendern bestehende Kontrollgruppe mit einem Durchschnittsalter von 27,4 Jahren litten weder an einer Parodontitis noch an einer anderen Erkrankung.

Jeder Patient wurde einer intensiven Anamnese unterzogen. Bei unklaren Anamnesen wurde der Patient internistisch untersucht.

Zur Objektivierung der Mundhygiene wurde der Approximalraum-Plaque-Index (API) nach LANGE et al. (1977) erhoben (53).

Die Entzündung der Gingiva wurde mittels Gingiva Index nach LÖE und SILNESS (1963) bestimmt (56).

Mit Hilfe des Periodontal Disease Index (PDI) nach RAMFJORD (1959) wurde das Maß der parodontalen Zerstörung objektiviert. Der PDI der erkrankten Patienten war gleich oder größer fünf (79).

Patienten und Normalpersonen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

5.3 Antigenpräparation

5.3.1 Zahnplaque-Entnahme und Präparation

Die Zahnplaque wurde in der Zeit zwischen 10.00 und 12.00 Uhr den Patienten und Spendern entnommen.

Mit einem warmen Wasserstrahl wurden die oberflächlichen Speisereste abgespült, die Zähne getrocknet und die Zahnplaque mit einem sterilen Excavator oralen, interdentalen und vestibulären Taschen entnommen. In Falcon mini tubes bzw. Reaktionsminitubes, die 1 ml sterile NaCl enthielten und gewichtsbestimmt waren, wurde das Entnahmegut gesammelt, anschließend die Tuben nochmals gewogen, um das Feuchtgewicht der gesammelten Zahnplaque pro Untersuchungsperson zu ermitteln.

Bei der Entnahme wurde darauf geachtet, daß kein Blut die Zahnplaque verunreinigte. Entsprechendes Entnahmegut wurde verworfen.

Im Labor wurde der autologe Zahnbelag im Verhältnis 1 : 1 in steriler Kochsalzlösung, der zuvor ein Antibiotikashutz von von 100 Einheiten Penicillin und 50 μg Streptomycin pro ml NaCl gegeben wurde, suspendiert. Für zwei Stunden wurde die Lösung in einem Desintegrator (MSE Ultrasonifikator) mit 1,5 Ampere beschallt.

Die Kühlung erfolgte über eine Eiswanne, so daß die Temperatur der Suspension sich während der gesamten Desintegrationszeit von -7°C bis $+4^{\circ}\text{C}$ erhöht.

Von jeder desintegrierten Zahnplaquesuspension wurde eine Probe entnommen, nach LÖFFLER und GIEMSA eingefärbt und im Durchlichtmikroskop einer Kontrollbetrachtung unterzogen.

Die beschriebene Desintegrationsmethode kann als Methode der Wahl angesehen werden, da sie eine effektive, schnelle, nicht arbeitsaufwendige und leicht zu beherrschende Technik darstellt.

Unter aseptischen Bedingungen wurden Verdünnungen von 0,3, 0,6 und 0,9 mg desintegrierter Zahnplaque pro ml Kochsalzlösung in Anlehnung an IVANYI und LEHNER (1971) hergestellt, zu je einem Milliliter konfektioniert und bei -20°C eingefroren, so daß wiederholtes Auftauen und Einfrieren ausgeschlossen wurden (36).

5.3.2 Isolierung und Kultivierung von Humanfibroblasten

Humanfibroblasten wurden aus der Haut und dem Thorax eines Embryos gewonnen (Abort 9. Woche post conceptionem). Die

präparierten Haut/Thoraxteile wurden in kleine Stücke geschnitten, in HANKS BSS gewaschen und in 0,04 %igem Trypsin in CMF-Puffer (Calcium-Magnesium-frei) für 20 min. bei 37°C in Einzelzellen dissoziiert. Nach Entfernen des Trypsins durch Zentrifugation wurden die Fibroblasten in komplettes Wachstumsmedium aufgenommen und nach einmaligem Waschen in HAM'S F 12 resuspendiert. In einem Haemocytometer wurden diese resuspendierten Zellen auf eine Zelldichte von $1,5 - 2,0 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium eingestellt und als Monolayer in Vierkantkulturflaschen in Wachstumsmedium eingesät.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Konzentration im Brutschrank.

Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei ausreichender Zelldichte erfolgte eine Subkultivierung - sog. Passagieren - der Zellen. Dazu wurden sie mit 0,04 %igem Trypsin in CMF-Puffer von der Flaschenwand gelöst, mit 1000 U/min für 10 min zentrifugiert, gewaschen und in HAM'S F 12 resuspendiert. Die Subkultivierung erfolgt bei Fibroblasten etwa nach 10 - 14 Tagen.

5.3.3 Desintegration von Humanfibroblasten

Zur Desintegrationsbehandlung wurden die Zellen manuell von der Kulturflasche gelöst und zu ca. 40 Mio. Zellen konzentriert. Pro Kulturflasche wurden im Haemocytometer ca. 3,5 bis 4×10^6 Zellen gezählt. Mit NaCl-Lösung wurden die Fibroblasten mit 1000 U/min dreimal gewaschen.

Das Sediment wurde mit 10 ml steriler NaCl-Lösung, die einen Antibiotikazusatz von 100 Einheiten Penicillin und 50 µg Streptomycin pro ml Lösung enthielt, aufgeschwemmt und in einem Ultrasonifikator MSE 60 W für 20 sec mit 1,5 A beschallt.

Die Kühlung erfolgte über eine Eiswanne, der Temperaturanstieg war zu vernachlässigen.

Von jedem Ansatz wurde nach der Beschallung eine Probe entnommen, nach LÖFFLER und GIEMSA gefärbt und unter einem Durchlichtmikroskop kontrolliert.

Desintegriert war der Ansatz, wenn mindestens 98% der ausgezählten Zellen nachweislich zerstört waren, in Anlehnung an REED et al. (1976) (81).

Unter aseptischen Bedingungen wurden die zerstörten Zellmembranen hochtourig mit 3000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufgenommen und vorläufig eingefroren, um nach einer Proteinbestimmung die erforderlichen Konzentrationen herstellen zu können.

Zur Bestimmung der Desintegrationskinetik bei konstanter Frequenz von 20 kHz und einer Temperatur von -7°C wurden Humanfibroblastenkulturen mit 1, 2, 4, 8, 10 Sekunden sowie 1, 2, 4, 8, 10 Minuten beschallt.

Als Kriterium der Zerstörung galt:

- a. der Fibroblast mußte seine sternförmigen Zytoplasmafortsätze aufgeben und sich zu einem kugeligen Gebilde abgerundet haben.
- b. die Fibroblastenmembran mußte mindestens eine Perforation aufweisen.
- c. die Kernmembran des Fibroblasten mußte mindestens eine Perforation aufweisen.
- d. das verbleibende Zyto- und Karioplasma sollte aufgrund des Ausschwimmens von Karioliplasma angefärbt sein.

Die effektive Beschallungszeit, bei der 100 % der Fibroblasten zerstört waren, wurde bei 10 sec ermittelt.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Zelluntersuchungen sind im Anhang abgebildet und beschrieben.

5.3.4 Proteinbestimmung

Dem Überstand wurde ein 1 ml Probe entnommen, um eine Gesamtproteinbestimmung nach dem Bio- Rad- und Biuret Proteinverfahren vorzunehmen (BIO- RAD LABORATORIES (1979) (4).

Die erste Bestimmung erfolgte mit den entsprechenden Standardlösungen im Spektralphotometer PM 6, die zweite im Spektralphotometer PMQ 2 mit einer Standardproteinkonzentration von 813,5 mg pro 100 ml.

Die im Untersuchungsfall benötigten Konzentrationen von 50 μ g, 100 μ g und 200 μ g pro 1 ml Kultur wurden durch sterile Kochsalzverdünnungen hergestellt. Der Kochsalzlösung wurden 100 Einheiten Penicillin und 50 μ g Streptomycin pro ml hinzugegeben.

Die Proteinlösungen wurden zu je einem Milliliter Vorratsvolumen eingefroren, so daß wiederholtes Auftauen und Einfrieren ausgeschlossen wurden.

5.4 Zellpräparation

5.4.1 Lymphozytenisolierung

Aus der Vena cephalica oder der Vena mediana cubiti wurden 30 ml peripheres Patientenblut in 10 IE Natrium-Heparin pro ml Blut aufgenommen und mit steriler Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt.

In Zentrifugationsstuben wurden 15 ml Ficoll-Paque gefüllt und darauf 30 ml NaCl-Blutsuspension vorsichtig mit einer Pipette überschichtet. Ein Verhältnis von 1 Teil Ficoll und 2 Teile Blutsuspension mußte eingehalten werden.

Mit 400 x g (1700 U/min) wurde für 35 min eine Gradientenzentrifugation vorgenommen. Ein Abbremsen der Zentrifuge nach Beendigung der Zentrifugation verbot sich, um die Lymphozyten, die sich als ein schwebender Ring zwischen Ficoll und Plasma-NaCl darstellten, isoliert zu halten.

Dieser Ring wurde vorsichtig in Zentrifugationsstuben (blue cap) abpipettiert und mit RPMI 1640 Medium 1 x konz. aufgeschwemmt. Durch 10-minütiges Zentrifugieren mit 400 x g sedimentierten die weißen Blutkörperchen auf den Boden der Tube. Der Überstand wurde verworfen, die Lymphozyten in PPN-Röhrchen überführt, mit 10 ml RPMI 1640 Medium 1 x konz. aufgeschwemmt und dreimal mit 400 x g jeweils 10 min gewaschen.

Nach dem dritten Waschvorgang wurden die Zellen in 5 ml RPMI 1640 Medium 1 x konz. aufgeschwemmt. Von dieser Suspension wurden 0,04 ml abgezogen und in 20 ml isotoner Kochsalzlösung zur Zählung vorbereitet.

Vor der quantitativen Erfassung dieses Zählansatzes wurden die eventuell verbliebenen Erythrozyten durch Zugabe von

Zaponin zur Lyse gebracht. Die Zählung erfolgte in einem elektronisch arbeitenden Zählgerät.

Die Zellangabe für 1 μ l wurde auf das vorhandene 5 ml Volumen umgerechnet und der Kulturansatz vorbereitet.

5.5 Methode des Protein-A Plaque-Assays

Die Sekretionskapazität von mononukleären Zellen kann durch den Protein-A Plaque-Assay qualitativ und quantitativ bestimmt werden (15, 65).

In diesem Nachweisverfahren werden Schafererythrozyten, welche mit Protein-A des *Staphylococcus aureus* gekoppelt wurden, mit Lymphozyten vermischt. Bei gleichzeitiger Gegenwart von Starterserum (Kaninchen) verbinden sich sezernierte Immunglobuline mit dem Kaninchenserum zu einem Immunkomplex. Da das Protein-A über einen freien Fc-Rezeptor für Immunglobulin verfügt, bindet sich der Immunkomplex über das Protein-A an den Erythrozyten.

Durch Zugabe von Komplement werden die Schafererythrozyten zur Lyse gebracht, und es entsteht der charakteristische Lysehof mit einem im Zentrum liegenden Immunglobulin sezernierenden Lymphozyten (s. Abb. 1 u. 2).

5.5.1 Lymphozytenkultivierung

Bedingung für den Kulturansatz sind 3×10^6 Lymphozyten, die in 3 ml RPMI 1640 Medium 1 x konz. suspendiert sind.

Im Untersuchungsfall wurden pro Patient kultiviert:

ein Ansatz

ohne jegliches Stimulans zur Erfassung der Spontanplaque,

ein Ansatz

mit unspezifischem Pokeweed-Mitogen zur Maximalstimulierung,

drei Ansätze

mit autologer, desintegrierter Zahnplaque zur experimentellen Erfassung der Fragestellung,

drei Ansätze

mit homologem Fibroblastenprotein zur experimentellen Erfassung der Fragestellung.

Das Ansatzschema ist im Anhang in Tabelle 3 dargestellt.

Erforderlich war ein Gesamtzellbedarf von 24 Mio. Lymphozyten in einem Gesamtvolumen von 24 ml RPMI-Medium 1640 1 x konzentriert. Als Sicherheit wurde mit einem Bedarf von 27 Mio. Zellen in 27 ml RPMI-Medium gearbeitet.

Der Quotient aus dem Gesamtzellbedarf und den gezählten Zellen, multipliziert mit 5 ml Suspensionsvolumen ergab dasjenige Volumen, welches aus der 5 ml Lymphozytensuspension entnommen werden mußte, um acht Ansätze mit je 3 Mio. Zellen zu erhalten.

Zu diesem Ansatzvolumen (AV) wurden noch

1 % des AV Penicillin/Streptomycin

1 % des AV L-Glutamin

10 % des AV fötales Kälberserum

hinzugefügt und mit RPMI-Medium auf 27 ml Gesamtansatzvolumen aufgefüllt. Pro Kulturröhrchen 16 x 125 wurden 3 ml Lymphozytensuspension einpipettiert, das jeweilige Stimulans

entsprechend dem Ansatzschema der Tabelle 3 hinzugefügt und die Röhrchen nur leicht verschlossen.

Die Lymphozytenisolierung und Kultivierung sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer 100 % wassergesättigten Atmosphäre und einer CO₂-Konzentration von 5% im Brutschrank für sieben Tage.

5.5.2 Beschichten der Erythrozytenmembran

15 ml einer Schafererythrozytensuspension wurden in einer Zentrifugationstube mit steriler Kochsalzlösung auf 50 ml aufgeschwemmt. Durch 10-minütiges Zentrifugieren mit 400 x g sedimentierten die Erythrozyten, so daß die überstehende Schicht (Buffy-coat Schicht) abgezogen werden konnte. Das rote Blutzellmaterial wurde noch dreimal gewaschen und war frei von Verunreinigungen.

Parallel dazu wurden 330 mg Chrom(III)chlorid reinst in 50 ml steriler Kochsalzlösung aufgelöst und 0,1 ml dieser CrCl₂-Lösung mit 9,9 ml steriler NaCl-Lösung zu einer Verdünnung 1 : 100 angesetzt.

Die dritte Komponente, 5 mg Protein-A des Staphylococcus aureus, wurde in 1 ml steriler NaCl-Lösung aufgelöst. 120 µl dieser Proteinsuspension wurden in 1,1 ml steriler Kochsalzlösung zu einer Verdünnung von 1 : 10 überführt.

In die vorhandene 10 ml Chrom(III)chloridverdünnung wurden nacheinander 1 ml der gewaschenen Schafererythrozyten-Suspension und 1 ml des Protein-A-Komplexes eingegeben, so daß ein Mischungsverhältnis von 10:1:1 vorlag.

Der Ansatz wurde für eine Stunde in ein Wasserbad mit 30° C zur Absorption gestellt, um dann mit steriler, gekühlter Kochsalzlösung auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert zu werden.

Der Erythrozytenniederschlag wurde abgefangen und noch dreimal mit Kochsalzlösung gewaschen. Der vierte Waschvorgang erfolgte mit HANKS BSS 1 x konz..

Der verbleibende Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit 1,3 ml HANKS BSS 1 x konz. resuspendiert, so daß eine isotone, beschichtete Indikatorerythrozyten-Suspension mit einem Hämatokrit von 30 % vorbereitet war.

Die Haltbarkeit der beschichteten Indikatorerythrozyten war auf drei Tage begrenzt.

Im Versuchsfall wurden die Indikatorerythrozyten am Tage ihrer Verwendung angesetzt, so daß sie immer frisch zur Verfügung standen.

5.5.3 Herstellung der Isogeversverdünnungslösung

Die Präparation der Verdünnungslösung für Komplement und Antiserum erfolgte am Tage des Plaquevorganges.

Durch Kochen wurden 200 mg Gelatine reinst in 20 ml Aqua dest. aufgelöst. Nach Abkühlung des Gels wurden

40 ml VBS-Puffer 5 x konzentriert
100 µl MgCl₂
100 µl CaCl₂

hinzugegeben.

Der Ansatz wurde ad 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und stand zur sofortigen Verfügung.

5.5.4 Komplementpräparation

Konfektioniertes lyophilisiertes Meerschweinchenkomplement wurde in 5 ml Isogevers aufgelöst.

Im Verhältnis 1 : 1 wurden 5 ml dreimal gewaschene Schaferythrozyten hinzugefügt und für eine Stunde im Kühlschrank zur Absorption aufbewahrt.

Die roten Blutzellen wurden 10 min hochtourig mit 2000 U/min abzentrifugiert und der Überstand abgefangen.

Im Verhältnis 1 : 7 wurde die abgefangene Komplementlösung mit Isogevers verdünnt, um sie dem Plaquevorgang zuzuführen.

5.5.5 Antiserumpräparation

Konfektioniertes Dako-Serum wurde in 2 ml Aqua dest. gelöst und mit 2 ml dreimal gewaschenen Erythrozyten für eine Stunde zur Absorption in einen Kühlschrank gestellt. Die Erythrozyten wurden anschließend 10 min hochtourig mit 2000 U/min abzentrifugiert. Das überstehende Antiserum wurde in 0,5 ml Portionen eingefroren.

Im Bedarfsfall wurde das Antiserum mit Isogevers 1:100 verdünnt und diente zur sofortigen Verwendung.

5.5.6 Herstellung des Grund- und Fixationsagars

5 g Agarose wurden durch zehnminütiges Kochen in 180 ml Aqua bidest. aufgelöst.

Durch Hinzufügen von 20 ml HANKS BSS 10 x konz. und 1 ml eines Penicillin/Streptomycinpräparates wurde der Agar

lagerungsfähig gehalten und eine Konzentration von 2,5% erreicht.

Das noch heiße Agargel wurde zu je 3 ml-Portionen in Gewebskulturschalen 60 x 15 mm einpipettiert. Nach zehnmündiger Abkühlung wurden die vorbereiteten Grundagarplatten kopfstellig für maximal vier Tage in einer feuchten Kammer deponiert.

Der Fixationsagar, auch als Monolayer bezeichnet, muß am Tage des Plaquevorganges angesetzt werden. 150 mg Indubiose A 37 wurden für fünf min in 22,5 ml kochendem Aqua dest. aufgelöst.

Zu dieser Lösung wurden 2,5 ml HANKS BSS Medium 10 x konzentriert einpipettiert. Damit war eine 0,6%ige Konzentration gegeben.

Kurz von dem Plaquevorgang wurden je 250 µl des Agars in Glasröhrchen einpipettiert und in 30°C warmem Wasserbad zur Verfügung gehalten.

5.5.7 Plaqueansatz

Nach siebentägiger Kultivierung wurden die stimulierten Lymphozyten aus dem Brutschrank entnommen. Nach gutem Durchmischen der Kultur wurden jeweils 0,04 ml der Suspension entnommen, in 20 ml isotoner Kochsalzlösung überführt und nach Zugabe von vier Tropfen Zaponin in einem Zähler gezählt. Die Angabe der Zellzahl pro µl mußte auf das Kulturvolumen von 3 ml umgerechnet werden.

Erst dann konnte durch 10 min Zentrifugieren mit 1500 U/min die stimulierten Lymphozyten in HANKS BSS 1 x konz. dreimal gewaschen werden.

Die gewaschenen, isolierten Zellen wurden anschließend auf 1 ml HANKS BSS 1 x konz. aufgeschwemmt und mußten zum Plaqueansatz, wie bereits beschrieben, nochmals gezählt werden, da für das Plaquen eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen in einem Mindestvolumen von 5 ml HANKS BSS Bedingung ist. Diese geforderte Zellzahl stellte der Quotient aus 5 ml Mindestvolumen HANKS BSS und den in 1 ml enthaltenen Zellen, multipliziert mit dem Faktor 0,1 dar. Das Rechenergebnis ist dasjenige Millilitervolumen, welches aus der 1 ml HANKS-Lymphozytensuspension entnommen und auf 5 ml HANKS BSS aufgefüllt werden mußte.

Das weitere Vorgehen erfolgte dann in chronologischer Reihenfolge:

Von der angesetzten 5 ml Lymphozytensuspension wurden 100 μ l in den erwärmten Indubioseagar eingegeben und mit 25 μ l beschichteter Indikatorerythrozyten vermischt. Dieses Gemisch wurde mit einer vorgewärmten Eppendorfpipette aufgenommen und auf den vorbereiteten Grundagar plan, blasen- und rissfrei in einheitlicher Schichtstärke aufgerührt. Diese mechanische Tätigkeit stellte die schwierigste und am längsten eingeübte Technik dar.

Nach zehnminütiger Abkühlung des Indubioseagars wurde mit 1 ml des 1:100 verdünnten Antiserums überschichtet und die Platten für 1,5 h im Brutschrank inkubiert.

Die Plaquephase und damit die Komplementbindungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml vorbereitetem Komplement und nochmaligem einstündigen Inkubieren der Platten im Brutschrank abgeschlossen.

Komplement und Antiserum wurden entfernt und die entstandenen Plaquehöfe ausgezählt.

Das Maß für die polyclonale Lymphozytenstimulation wurde aus dem Produkt der ausgezählten Plaquehöfe, der in 3 ml Kultur enthaltenen stimulierten Lymphozyten und einem Umrechnungsfaktor 100 ermittelt.

Zur Objektivierung jedes Plaqueansatzes wurde eine vorbereitete Agarkulturschale ohne Lymphozyten, eine Schale ohne Antiserum und eine Schale ohne Komplement angesetzt. Zeigten sich bei den Kontrollansätzen Plaquehöfe, war der Gesamtansatz nicht auszuwerten.

In Abbildung 4 ist eine Kulturschale mit Plaquehöfen photographisch festgehalten.

5.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte über den Wilcoxon-Test, einer verteilungsfreien Methode bei zweiseitiger Gegenüberstellung.

Als signifikanter Unterschied wurde $2\alpha \leq 0,05$ gewertet.

Die graphischen Darstellungen erhalten den Median ($\bar{x}$).

6. ERGEBNISSE

6.1 Kinetik der Fibroblastendesintegration

Die Ultraschallbehandlung der in vitro gezüchteten Humanfibroblasten wurde in Anlehnung an die von REED et al. (1976) beschriebene Methode der Plaquesintegration durchgeführt (81).

Um eine Desintegrationskinetik bestimmen zu können, wurden je zwei Milliliter Fibroblastensuspension mit je 1, 2, 4, 8 und 10 Sekunden sowie mit 1, 2, 4, 8 und 10 Minuten beschallt.

Bei einer Frequenz von 20 000 Hz, einer Stromstärke von 1,5 A und konstanter Temperatur von -7° Celsius zeigte sich, daß 50% der Fibroblastenpopulation bereits nach drei Sekunden, die Gesamtpopulation nach 10 Sekunden Beschallungszeit desintegriert war. Das Kriterium der Abrundung bzw. Verlust der sternförmigen Struktur als Beweis der Zerstörung muß unter der Tatsache berücksichtigt werden, daß Fibroblasten sich in isotonen Lösungen prinzipiell abrunden. Daher kann dieses Kriterium nur in Verbindung mit den übrigen Postulaten gelten (s. S. 34).

Die Tabelle 6 sowie die Abbildung 5 geben die prozentuale und graphische Abhängigkeit zwischen Desintegration und der Beschallungszeit wieder.

Die Ausstriche der als Vorversuch durchgeführten Desintegration, wurden photographisch festgehalten, um das qualitative und quantitative Ausmaß des in vitro-Versuches festzuhalten. Ferner geben die Abbildungen (s. Abb. 27 - 31) Aufschluß über den gesetzmäßigen Ablauf der Lyse.

Die Lyse der Fibroblasten beginnt mit der Perforation der Zellwand. Dabei kann die Zellkernmembran bereits beteiligt sein. Das Protoplasma wird mit oder ohne Karioplasma ausgeschwemmt. Die Nucleoli bleiben erhalten, zeigen aber gelegentlich Aufblähungen. Bei der Desintegrationszeit von vier Sekunden sind ca. 80% der Bindegewebszellen perforiert, die Kariolyse ist histologisch in Form von Fahnen- bzw. Schlierenbildung zu verfolgen. Die Nucleoli beginnen sich aufzulösen.

Jede weitere Erhöhung der Beschallungszeit führt zu weiterer Fragmentierung der Bindegewebszellen bis hin zur vollkommenen Auflösung (Beschallungszeiten über 10 sec.).

6.2 Quantitative Bestimmung von Fibroblastenprotein

Die Ergebnisse der Gesamtproteinbestimmung sind in Abbildung 6, 7 und 8 dargestellt.

Die Abbildung 6 gibt das Verfahren nach Bio-Rad, die Abbildung 7 und 8 nach der Biuret-Methode wieder. Beide Nachweisverfahren unterscheiden sich in ihrer Systematik unwesentlich. Die Verwendung unterschiedlicher Standardproteine haben die Meßergebnisse nur bestätigt. Im Vorversuch konnte ein Proteingehalt von 200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ im Überstand bestimmt werden. Dies entspricht einem Gesamteiweißgehalt von 2 mg pro Milliliter Ansatz. Bei einem Ansatzvolumen von 40 Mio. Zellen in 10 ml ist daraus zu entnehmen, daß eine Million Fibroblasten ca. 0,05 mg Gesamtprotein enthalten.

Der Umrechnungsfaktor nach dem Bio-Rad-Verfahren betrug entsprechend der Angabe des Herstellers 1,41 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der

Gesamtproteingehalt errechnete sich nach $C = E \times 1,43$ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Meßergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 aufgelistet.

6.3 Proliferative Transformation peripherer Lymphozyten auf antigene und mitogene Stimulation

Die proliferative Antwort der weißen Blutkörperchen auf Antigene und Mitogene sowie deren Spontanreaktionen (Nihil) sind in Tab. 4 und Tab. 5 gegenübergestellt.

Die Tab. 4 weist alle experimentell gewonnenen Werte in Abhängigkeit von der Stimulationskonzentration aus. Ferner enthält sie die sogenannten Null- bzw. Spontanwerte (Nihil). Die Tab. 5 vergleicht alle gemittelten Werte der optimalen Stimulationskonzentrationen und der Spontan-Antwort sowie deren Gesamtdurchschnitt.

Zur Bestimmung einer Dosis-Antwort-Beziehung wurden drei Verdünnungen von 30, 60 und 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ autologer, desintegrierter Zahnplaque sowie 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ homologes Fibroplastenprotein getestet.

Die Abb. 8 zeigt das Stimulationsverhalten der drei autologen Zahnbelagskonzentrationen sowohl bei Patienten mit Parodontitis marginalis profunda als auch bei den Normalpersonen. Die graphische Darstellung weist ein Stimulationsoptimum bei 60 μg pro ml Kultur aus, wobei die Transformationsaktivitäten aller drei Konzentrationen unterschiedlich sind.

Die Spendergruppe zeigt im Vergleich zum erkrankten Patientengut sowohl in der Neben- als auch in der Optimumkonzentration in der Tendenz höhere Transformationswerte. Auffällig ist dies besonders bei 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kultur. Aus der Gruppe

ragt die Normalperson A durch besonders hohe Aktivierbarkeit heraus. Auch findet sich das Stimulationsoptimum bei 90 $\mu\text{g/ml}$ Kultur, wobei der durchschnittlich nominative Unterschied zu 60 $\mu\text{g/ml}$ Kultur nur 670 Plaquewerte beträgt (s. Tab. 4).

Das Krankengut zeigt ebenfalls eine hohe proliferative Antwort der Blutlymphozyten bei 60 $\mu\text{g/ml}$ Kultur. In den beiden Nebenkonzentrationen zeigen die erkrankten Patienten eine relative Stimationskonstanz während die Optimumwerte eine größere Streuung aufweisen. Eine außergewöhnliche Stimulationsaktivität in allen drei Konzentrationsbereichen zeigt die Patientin Nr. 7. Das Ausmaß dieser Antwort fällt weit außerhalb der Meßbreite und wurde mit Zurückhaltung gewertet. Relativ geringe Stimulationsbereitschaft auf das polyclonale Zahnbelagsantigen zeigen die Patienten Nr. 3, 4, 8 und 10.

Die Dosis-Antwort-Beziehungen der homologen Fibroblastenverdünnungen sind in Abb. 10 dargestellt.

Die Graphik weist ein Stimulationsoptimum bei 100 μg pro Milliliter Kulturlösung aus. Die Transformationsunterschiede sind innerhalb der Spendergruppe relativ gering, innerhalb des Patientengutes relativ groß. Der Vergleich zwischen an Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und den Normalpersonen zeigt in der Konzentration der Maximalstimulation eine wesentlich höhere proliferative Antwort in dem erkrankten Patientengut. Auch in den Nebenkonzentrationen ist die Transformationsbereitschaft, sich in Immunglobulin sezernierende Zellen umzuformen, größtenteils höher als bei den Normalpersonen, deren Streubreite ebenfalls geringer ist.

Eine äußerst geringe Stimulationsbereitschaft auf das homologe Fibroblastenprotein zeigen die Patienten 3 und 4,

während alle anderen Patienten hohe bis sehr hohe Antworten erteilen.

Die mitogen-bedingte Transformationsantwort aller experimentell gewonnenen Werte sind in Abb. 11 dargestellt.

Da die Kinetik, Reproduzierbarkeit und die Dosis-Antwort-Beziehung bekannt waren, wurden diesbezüglich keine Versuche durchgeführt und die Kulturen mit 5 μ l pro Milliliter Kultur inkubiert.

Die mitogen-bedingte Differenzierung der Lymphozyten in sezernierende Zellen ist sehr breit gestreut, so daß der Vergleich zwischen dem gesunden und erkrankten Klientel keine nennenswerten Unterschiede aufzeigt. Lediglich eine tendenziell erhöhte Aktivierbarkeit ist im Normalgut zu erkennen, welche aber von der Normalperson D mit extrem niedrigen Werten relativiert wird.

Der Vergleich innerhalb des Patientengutes zeigt eine hohe mitogene Toleranz der Patienten 3, 4, 5 und 9 im Gegensatz zu 1, 2, 6, 7 und 10.

Größere Wertabweichungen sind bei Patient 10 und der Normalperson C zu finden.

6.4 Vergleich der spontanen Plaquebildung zwischen Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und den Normalpersonen

Die spontane Transformationsbereitschaft peripherer Lymphozyten, sich ohne antigene und mitogene Aktivierung in Immunglobulin sezernierende Zellen zu verwandeln, beschreibt einerseits eine latent vorhandene Potenz dieser Zellen, außerhalb ihres Blutmilieus Immunglobulin zu bilden, ande-

rerseits auch eine Empfindlichkeit des Protein-A Plaque-Assays.

Die Abb. 12 zeigt alle experimentell gewonnenen Spontanwerte des erkrankten Patientengutes im Vergleich zur Spendergruppe. Die Durchschnittswerte beider Untersuchungsgruppen liegen dicht beieinander, $\bar{x}$ der erkrankten Patienten mit 515, die Normalpersonen mit 536 Plaquehöfen. Eine Signifikanz ist nicht zu ermitteln.

Vergleicht man einzelne Probanden, so neigen die Normalpersonen A und D und die Patientin Nr. 7 zu hoher spontaner proliferativer Antwort bei gleichzeitigen hohen mitogenen und antigenen Stimulationen. Eine Korrelation zwischen hoher spontaner Potenz und hohen Stimulationswerten kann generell nicht bestätigt werden. Eine hohe Spontanbereitschaft um den arithmetischen Mittelwert von 515 Plaque formenden Zellen (PFZ)-bei normalen Durchschnittswerten nach Aktivierungsweisen die Patienten 5 und 8 auf, Patient 9 zeigt Spontanbereitschaft um den Mittelwert, aber hohe homologe Fibroblastenaktivität bei niedriger mitogener Stimulation. Die Patienten mit niedriger Stimulationsantwort zeigen bei der Spontanplaque mäßig hohe Werte, während umgekehrt die Patienten 2 und 10 mit niedrigen Spontanwerten hohe bis höchste mitogene und antigene Aktivitäten auszeichnen (s. Tab. 5).

Obwohl keine statistische Signifikanz nachweisbar ist, die experimentelle Werteskala bei den erkrankten Patienten sich weit fächert, ist auffallend, daß die Bereitschaft zur spontanen Reaktion bei den Normalpersonen tendenziell geringer ist (s. Tab. 4 u. 5; Abb. 12).

6.5 Polyclonale B-Lymphozytenstimulation mit desintegrierter, autologer Zahnplaque

Die proliferative Antwort peripherer Lymphozyten nach Aktivierung mit 60 µg autologem, desintegriertem Zahnbelag zeigt bei den erkrankten Patienten und den Normalpersonen einen unterschiedlichen Stimulationsgrad.

Die Abbildung 13 gibt die experimentell erhaltenen Werte aus Tabelle 4 wieder.

Der arithmetische Durchschnittswert $\bar{x}$ des erkrankten Patientengutes liegt bei 1945 Plaque formenden Zellen. Der untere Grenzwert liegt bei 750, der obere bei 3800 PFZ. 55% der erhaltenen Ergebnisse liegen in einem Kernbereich zwischen 1500 und 2500 PFZ. Mit zwei Plaquewerten von 36 360 und 49 010 liegt die Patientin Nr. 7 weit außerhalb eines zulässigen Streubereiches. Beide Werte wurden daher bei der Berechnung des Medianwertes und der Signifikanz nicht berücksichtigt.

Die Normalpatienten zeigen ein wesentlich höheres Stimulationsverhalten, wobei der Streubereich deutlich größer ist. Der Medianwert liegt bei $\bar{x} = 4100$ PFZ bei einem Maximalwert von 11000 gegenüber minimal 690 PFZ. Im Kernbereich zwischen 2000 und 3000 Plaques liegen 60% der Spender.

In der Abbildung 14 sind die gemittelten Werte zweier erkrankter Patienten einer Normalperson zugeordnet. Die gemittelten Werte sind der Tabelle 5 entnommen, die Zuordnung erfolgte vor Versuchsaufnahme. Die Graphik verdeutlicht, daß alle Normalpersonen durch autologes Zahnbelagsantigen deutlich stimulierbarer sind als die erkrankte Patientenpopulation. Vier Gruppierungen zeigen eine Erhöhung um rund 600 PFZ, eine Gruppierung, Pat. 1, 2 mit Normalperson A, eine Zunahme um 6300 PFZ.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die polyclonale B-Lymphozytenstimulation mit autologer, desintegrierter den-

taler Plaque bei erkrankten Patienten gegenüber einer Spendergruppe mit $2\alpha \leq 0,10$ zwar nicht signifikant ist, doch mit $T_+=6$ und $T_-=39$ sehr nahe an der Grenze zu $2\alpha \leq 0,05$ liegt und damit Signifikanz anzeigt. Der Plaquewert der Pat. Nr. 7, gestrichelte Linie, ist nicht berücksichtigt.

6.6 Polyclonale B-Lymphozytenstimulation mit homologem Fibroblastenprotein

Die Umwandlung peripherer weißer Blutkörperchen in immunpotente Zellen von zehn an Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und fünf Normalpersonen nach Aktivierung mit homologem Fibroblastenprotein zeigt Abbildung 15, die alle experimentellen Ergebnisse der Tabelle 4 wiedergibt.

Die erkrankte Patientenpopulation zeigt eine außerordentlich breite Streuung. Der unterste Grenzwert liegt mit 800 Plaques um 7450 Werten unter dem obersten von 8250 PFZ, ohne daß sich ein Kernbereich ablesen läßt. Der Medianwert $\bar{x}$ liegt bei 3239 PFZ.

Die Spendergruppe weist geringere Transformationsindizes und eine engere Streubreite auf. Der Medianwert $\bar{x}$ beträgt 2209 PFZ, die Werteskala reicht von minimal 1000 bis maximal 3640 PFZ. Im Kernbereich zwischen 1500 und 2000 PFZ liegen 50% der experimentell gewonnenen Werte.

Die Patient-Spender zugeordnete graphische Darstellung zeigt ein unterschiedliches Proliferationsverhalten (s. Abb. 16). In zwei Gruppierungen zeigen die Normalpersonen mäßig höheres Stimulationsverhalten, während drei Zuordnungen starke Transformationsgefälle aufweisen.

Vier von 10 Patienten liegen um mehr als 1500 Plaques, zwei um mehr als 300 Plaques höher als ihre Referenzpersonen. Die beiden Referenzpersonen, die höher als die ihnen zugewiese-

nen erkrankten Patienten plaqen, müssen unter dem Umstand betrachtet werden, daß die Normalperson A prinzipiell höchste Ergebnisse nicht nur im Nihil aufweist, wohingegen die Normalperson B mit den Patienten 3 und 4 verglichen wird, die äußerste Toleranzen gegenüber allen Stimulantien aufweisen.

Der mediane Transformationsunterschied der erkrankten Gruppe zur gesunden ist mit $T_+ = 43$ und $T_- = 7$ statistisch signifikant ($2\alpha \leq 0,05$).

Es kann von der Signifikanz geschlossen werden, daß homologes Fibroblastenprotein Lymphozyten parodontal erkrankter Patienten in höherem Maß in Immunglobulin sezernierende Zellen verwandelt, als es bei Normalpersonen der Fall ist.

6.7 Pokeweed-Mitogen-induzierte Lymphotzytenstimulation

Um die Lymphozytentransformation zu objektivieren, wurde das T- und B-Zell abhängige künstliche PWM als Vergleichsstimulans in den Versuch mit einbezogen.

Die Abbildung 17 vergleicht 20 Meßergebnisse des erkrankten Patientengutes mit zehn der Spendergruppe (s. Tab. 5).

Das Patientengut beschreibt eine breite Plaquewertskala, welche von 720 bis 8920 Plaque formenden Zellen reicht. Der arithmetische Durchschnittswert beträgt 4106 PFZ. Eine Wertverdichtungszone, in der 45% der Meßergebnisse sich bestätigen, liegt im Bereich zwischen 1000 und 2500 PFZ. Vergleicht man patientenbezogene Einzelergebnisse aus Tabelle 5, so zeigen die Patienten 3 und 4 konstant die niedrigste Stimulationsbereitschaft. Die Patienten 5 und 9, welche sich durch hohe Nihil- und Fibroblastenproteinergeb-

nisse bei mittleren Plaquewerten der antigenen Zahnplaque-stimulation auszeichneten, sind gegenüber PWM relativ unempfindlich. Die Patientin 10 hingegen mit niedrigstem Nihilwert und durchschnittlichen antigenen Proliferationen reagiert höchst empfindlich auf das künstliche Mitogen. Der Patient 8 weist bei hoher Spontanplaque und mäßigen antigenen Stimulationsantworten eine geringere mitogene Empfindlichkeit auf. Demgegenüber zeigen die Patienten 1 und 6 niedrige Spontanantwort, mittlere Stimulationsbereitschaft auf ihre Zahnplaque und reservierte Empfindlichkeit auf zytoplasmatisches Fibroblastenprotein, jedoch hohe mitogene Proliferation. Trotz höchster Sensibilität in allen nicht aktivierten und antigen-stimulierten Kulturen zeigt sich die Patientin 7 mitogen verhaltener.

Die Relationen des Krankengutes bestätigen sich in der Kontrollgruppe nicht (s. Abb. 17). Der Medianwert $\bar{x}$ liegt um 2037 Plaquewerte höher, die Streuung reicht von 220 bis 11020 PFZ. Der Kernbereich der Spenderergebnisse liegt mit 60% zwischen 5000 und 8000 Plaques. Auffallend ist die große mitogene Toleranz des Normalpatienten E dessen beide Plaquewerte unter 2000 PFZ liegen, während alle anderen Personen über 5000 Zellen liegen (s. Tab.5).

Die spenderbezogene Zuordnung zweier erkrankter Patienten zeigt Abbildung 18. Obwohl keine statistische Signifikanz mit $T_+ = 13$ und $T_- = 42$ ermittelt werden konnte, kann aus der Graphik abgeleitet werden, daß, ausgenommen Patienten 7, 9 und 10, alle Kranken mitogen weniger aktivierbar sind als ihre Normalperson. Die Zuordnung 9, 10 zu E bricht deswegen aus der graphischen Konstanz heraus, weil die Normalperson E generell äußerste Reserviertheit gegenüber allen Stimulantien auszeichnet (s. Tab. 5). Tendenziell reagieren erkrankte Patienten weniger aktiv auf das künstliche PWM als ihre Normalpersonen.

6.8 Antigen- und mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation aller Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten und Normalpersonen im Vergleich

Die Gegenüberstellung aller antigen- und mitogen-bezogenen Transformationswerte von erkrankten und gesunden Untersuchungspersonen ist in Abbildung 19 und 20 graphisch dargestellt.

Der arithmetische Medianwert $\bar{x}$ der antigenen und der mitogenen Aktivierung weist aus, daß die an Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten durch das PWM am höchsten, weniger durch das homologe Fibroblastenprotein und am geringsten durch desintegrierte, autologe Zahnplaque stimulierbar sind.

Vergleicht man dagegen die Normalpersonen (s. Abb. 17 u. 20), so objektiviert sich das PWM mit einer Zunahme des Medianwertes $\bar{x}$ um 2037 als effektivstes Stimulans.

Die homologe und autologe Aktivierbarkeit der Lymphozyten, sich in Immunglobulin sezernierende Zellen zu verwandeln, kehrt sich zugunsten der autologen, dentalen Plaque um. Die Empfindlichkeit der Spender steigt auf den Medianwert $\bar{x}$ von 4100 PFZ gegenüber $\bar{x}$ von 1945 des erkrankten Gutes.

Die homologe Fibroblastenproteinempfindlichkeit reduziert sich von $\bar{x} = 3239$ PFZ der erkrankten Patienten auf $\bar{x} = 2209$ PFZ der Normalpersonen.

6.8.1 Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen Pokeweed-Mitogen und autologer Zahnplaque bei Patienten und Normalpersonen

Um die transformative Potenz der Antigene und des Mitogens charakterisieren zu können, müssen die Lymphozytentransformationen personenbezogen zugeordnet werden.

Die Abbildung 21 zeigt die Zuordnung der gemittelten Zahnplaque- und PWM-Ergebnisse aus Tabelle 5 bei dem erkrankten Patientengut. Es ist abzulesen, daß das künstliche PWM eine wesentlich höhere Transformation erzeugt als die desintegrierte Zahnplaque. Der Medianwert $\bar{x}$ liegt um 2162 PFZ höher als die autologe Antigenaktivierung. Der Transformationsunterschied ist mit $T_+ = 4$ und $T_- = 41$ statistisch mit $2\alpha \leq 0,05$ signifikant. Die graphische Darstellung demonstriert ferner, daß Patienten mit niedrigen autologen Antigenwerten (Pat. 3 u. 4) auch niedrige mitogene Aktivität zeigen. Mittlere bis hohe Unterschiede weisen insgesamt 70% der Patienten auf. Lediglich bei einer erkrankten Person ist ein Abfall von 300 Plaquewerten bezüglich des PWM zu verzeichnen. Die Patientin 7 wurde ausgeklammert, gestrichelte Linie. Vergleicht man den Steigungswinkel der Verbindungsgeraden, so kann auch die Patientin 7 eine Tendenz erkennen lassen. Hohe antigene proliferative Antworten, wie sie die Patienten 1, 2 und 7 besitzen, zeigen eine Abflachung der Verbindungsgeraden zur mitogenen Antwort, die, wie Patientin 7 zeigen kann, auch in einer Umkehr endet.

Diese Tendenz ist auch bei den Normalpersonen in Abbildung 22 zu belegen. Die Normalperson A mit höchster Antigenproliferation deutet, wie z.B. auch Spender E, einen Grenzbereich an, wo das Antwortpotential sich erschöpft. Der mediane Transformationsunterschied ist mit $T_+ = 3$ und $T_- = 12$ nicht signifikant, obwohl die mitogene Stimulation um 2043 PFZ höher liegt.

6.8.2 Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen Pokeweed-Mitogen und zytoplasmatischem Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen

Eine eindeutige Aussage bei der patientenbezogenen Untersuchung zwischen PWM und Fibroblastenprotein ist, wie die Abbildung 23 zeigt, nicht möglich. Die Medianwerte $\bar{x}$ liegen um 567 Plaquepunkte auseinander, eine Signifikanz ist mit $T_+ = 13$ und $T_- = 37$ nicht zu erwarten.

Eine mitogene Abhängigkeit zeigt dagegen das Spenderklientel in Abbildung 24 mit eindeutiger Tendenz. Die mediane Fibroblastenproteinstimulation liegt um 3934 PFZ tiefer als die künstliche. Auffallend ist bei 4 von 5 Patienten die Steigungskonstanz der Verbindungsgeraden, was auf konstante Proliferationsdifferenzen schließen läßt. Der Spender E bricht aus dieser Eindeutigkeit heraus. Obwohl die Plaque-differenzen der Normalpersonen A, B, C und D jeweils ca. 4000 Plaqueeinheiten betragen, ist die Beziehung mit $T_+ = 1$ und $T_- = 14$ nicht signifikant, obwohl sie nahe am Vertrauensbereich $2\alpha \leq 0,10$ liegt. Es kann aus der Abbildung geschlossen werden, daß die Kontrollgruppe gegenüber dem zytoplasmatischen Fibroblastenprotein eine relative Toleranz besitzt.

6.8.3 Vergleich der Lymphozytentransformation zwischen autologer Zahnplaque und zytoplasmatischem Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen

Die Abbildung 25 vergleicht zwei antigen-induzierte Lymphozytentransformationen bei dem erkrankten Patientengut. Die Stimulationswerte sind der Tabelle 5 entnommen. Die graphische Darstellung zeigt die höhere Aktivierbarkeit der weißen Blutkörperchen mit homologem Fibroblastenprotein. Der Trans-

formationsunterschied zur Zahnplaque liegt um durchschnittlich 1294 PFZ höher.

Alle Patienten, die bei der antigenen Zahnplaquestimulation im Kernbereich zwischen 1500 und 2000 PFZ (s.Tab.5) liegen, weisen einen hohen Stimulationsanstieg zum Fibroblastenprotein auf. Dies wird durch die steile Verbindungsgerade verdeutlicht.

Oberhalb des Kernbereiches kehrt sich die Verbindungsgerade um. Es kann daher gefolgert werden, daß sich das Aktivierungspotential der Fibroblastenproteine erschöpft hat.

Der mediane Transformationsunterschied ist mit $T_+ = 10$ und $T_- = 35$ statistisch nicht nachweisbar.

Bei den Spendern ist die Transformationsantwort peripherer Lymphozyten auf die Antigene der Zahnplaque empfindlicher als auf die der Bindegewebszelle (s. Abb. 26). Das lymphozytäre Stimulationsverhalten kehrt sich um. Der durchschnittliche Stimulationswert liegt um 1891 PFZ höher. Der signifikante Unterschied von $2\alpha \leq 0,10$ kann unter Berücksichtigung des 5%-Vertrauensbereiches bei fünf Untersuchungspersonen nicht geltend gemacht werden. Er ist aber dahingehend aussagekräftig, daß Normalpersonen auf Zahnbeläge wesentlich empfindlicher reagieren als auf homologes Fibroblastenprotein (vgl. 6.8.2).

7. DISKUSSION

7.1 Allgemeine Vorbemerkung

Humorale und zelluläre Immunantworten sind bei Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis durch zahlreiche in vitro-Versuche untersucht und nachgewiesen worden.

Es bedarf keines Nachweises, daß immunkompetente Zellen, welche sowohl antigen als auch mitogen stimuliert werden, nur diejenige Funktionen übernehmen können, die ihnen durch genetische Determinierung zugewiesen sind. Zu diesen Funktionen gehören Zellteilung, zytotoxische Aktivität, Sezernierung von Antikörpern, Mediatorenfreisetzung sowie die Funktion von Helfer- bzw. Suppressorzellen. Die physiologische Potenz der lymphozytären Zellen ist abhängig von dem biologischen Differentiations- und bzw. oder dem Erkrankungsstadium.

Um die allgemeine Stimulierbarkeit im Versuchsfall zu klären, mußte die lymphozytäre Antwort über das PWM objektiviert werden. Daher mußte untersucht werden, ob PWM bei der Patienten- und Spendergruppe unterschiedliche stimulatorische Aktivität besitzt.

Der Rolle als Referenzstimulans kann PWM nur dadurch gerecht werden, indem es B-Zellen nur mit Unterstützung sogenannter T-Helferzellen polyclonal zur maximalen Sezernierung von Immunglobulin aktiviert. Die Umwandlung in eine sezernierende Zelle erfolgt durch den Einbau des PWM in die DNA der T-Helfer- und B-Lymphozyten (18, 91). Es gestattet ferner, die Rolle der T-Helferzellen einzelner Probanden näher zu untersuchen.

7.2 Pokeweed-Mitogen-induzierte polyclonale Lymphozytenstimulation bei Patienten und Normalpersonen

Die Abbildungen 17, 19 und 20 zeigen, daß PWM sowohl bei der erkrankten als auch bei der gesunden Untersuchungsgruppe zu durchschnittlich höchster Immunglobulinsekretion führt. Ebenso wie die Abbildungen 19 und 20 zeigen die graphischen Darstellungen 21, 22, 23 und 24 durchschnittlich höhere mitogene Plaquewerte im Vergleich zur antigenen Stimulierung.

In der Gegenüberstellung der Patienten mit den Normalpersonen in Abb. 18 fällt die durchschnittlich geringere Lymphozytenstimulation bei den Patienten auf, obgleich eine statistische Signifikanz nicht nachzuweisen ist (s. 6.7).

Zur Klärung dieses Transformationsverhaltens müssen die T-Lymphozyten näher beschrieben werden. Die Aktivität der B-Lymphozyten steht unter dem Einfluß zweier Subpopulationen der T-Lymphozyten. Diese beiden Untergruppen bestehen aus einer inhibitorischen Komponente, sogenannte T-Suppressorzellen, und einer exhibitorischen Komponente, sogenannte T-Helferzellen. PWM ist in seiner stimulativen Potenz bezüglich der B-Lymphozyten stark T-Zell abhängig im Sinne der T-Helfer Population (KEIGHTLY et al., 1974; MILLER, 1980) (44, 69).

Es muß daher angenommen werden, daß bei den erkrankten Personen eine Unterdrückung von T-Helferzellen bei ausgeglichenem Bestand von Suppressor- zu Helferzellen besteht - oder umgekehrt - ein qualitatives und/oder quantitatives Überwiegen der Suppressorzellen vorliegt. Die Variationsbreite der lymphozytären Beeinflussung ist groß, wie die Ergebnisse der Patienten ausweisen (s. Tab. 4 u. 5; Abb. 18 u. 19; vgl. 6.7).

Die Gruppe der Normalpersonen zeigt innerhalb dieser Arbeit auf PWM die höchste proliferative Antwort (s. Abb. 19 u. 20; Tab. 5). Besonderes Augenmerk fällt auf die Normalperson E, die nicht nur innerhalb der Spendergruppe niedrigste Plaquewerte aufweist, sondern auch niedrige Werte gegenüber dem Patientenauftreten. Die PWM bedingte Transformation zu einer Immunglobulin sezernierenden Zelle muß massiv unterdrückt sein. Dies kann nur dadurch erklärt werden, daß entweder T-Helferzellen unterdrückt werden oder T-Suppressorzellen überwiegen. Interessant ist noch die Tatsache, daß die Normalperson (Student im Hause) nach Abschluß der Untersuchungen auf nochmalige Befragung zugab, sich zwei Jahre zuvor einer Gingivektomie unterzogen zu haben.

Der Nihil-Wert dieser Person liegt im Bereich des Normalen, die proliferative Antwort auf Zahnbelagsantigen und Fibroblastenprotein deutlich unterhalb des Medianwertes (s. Tab. 5).

Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Normalperson E dafür verantwortlich ist, daß die medianen Transformationsunterschiede der beiden Antigene im Vergleich zu PWM bei den Normalpersonen nicht signifikant, jedoch nahe an der Grenze zur Signifikanz gelagert sind (s. 6.8.1, 6.8.2; Abb. 22 u. 24).

Im Gegensatz zu Spender E zeigt Spender A erhöhte Plaquebereitschaft auch ohne Stimulans. Diese Reaktionsbereitschaft muß unter Berücksichtigung der Tatsache gesehen werden, daß er mit den Patienten 1 und 2 tendenziell höhere Plaquewerte erreicht (s. Tab. 2 u. 5). Besondere Umstände, wie z.B. reaktionsfreudige Erythrozyten, die diesen Laborversuch begünstigten, können nicht ausgeschlossen werden.

Daß aus Kontrollgruppen einzelne Personen ausbrechen können, hat FAUCI (1979) beschrieben. Er berichtet von 10% der Normalpersonen, die in vitro auf immunologische Untersuchungen mit dem Protein-A Plaque-Assay nicht oder nur schlecht antworteten (20).

7.3 Polyclonale B-Lymphozytenstimulation auf autologe Zahnplaqueantigene bei Patienten und Normalpersonen

Die zelluläre Immunantwort auf gezüchtete, desintegrierte Mundhöhlenbakterien und auf dento-gingivale Plaque nimmt mit steigendem Grad des PDI zu. Diese Beziehung kann als linear bis PDI 4 angesehen werden. Oberhalb dieses Indexes fällt die Immunantwort bis auf das Niveau von Normalpersonen zurück, wenn autologes Serum verwendet wird (IVANYI und LEHNER, 1971) (36).

Die Autoren vertreten die Ansicht, daß in vivo und in vitro die Stimulation durch einen im Serum vorhandenen inhibitorisch wirkenden Faktor (Antikörper) unterdrückt werden muß. Als Stimulans verwendeten sie *Veillonella alcalescens*.

HORTON et al. (1972, 1974) konnten dagegen auf eine linear zunehmende Beziehung zwischen dem Schweregrad der parodontalen Schädigung und der Lymphozytenstimulation durch Zahnplaqueantigene verweisen. Die "lokale parodontale Nekrose", die Atrophie des Bindegewebes und der chronisch entzündliche Prozeß sind ursächlich mit den Antigenen der Zahnplaque verknüpft (28, 31).

Das stimulative Verhalten von peripheren Lymphozyten der erkrankten und gesunden Untersuchungspersonen nach Aktivierung mit 60 µg Zahnbelagsantigen zeigen die Abbildungen 10, 13, 14, 19 und 20. In Abbildung 21, 22, 25 und 26 sind die Stimulantien miteinander in Beziehung gesetzt.

Im Gegensatz zum PWM, welches sowohl bei den Patienten als auch bei den Normalpersonen durchschnittlich höchste Aktivierung aufweist, können die Ergebnisse bei der Stimulierung mit autologer Zahnplaque nicht bestätigt werden. Die Normalpersonen zeigen eine größere Lymphozytenaktivierung als das erkrankte Patientengut (s. Abb. 19, 20). Die vergleichende Gegenüberstellung in Abb. 14 zeigt signifikante Tendenz.

In diesem Sinn kann bestätigt werden, daß Patienten mit fortgeschrittener parodontaler Erkrankung in ihrer Lymphozytenantwort weniger stimulierbar sind als die Normalpersonen. Die Umwandlung in Immunglobulin sezernierende Zellen ist im Vergleich mit den Normalpersonen tendenziell signifikant (s. 6.5).

Es muß daher die Frage geklärt werden, ob die an Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten in ihrer Aktivierbarkeit zu Immunglobulin sezernierenden Zellen gehemmt bzw. tolerant sind, oder ob die Normalpersonen gegenüber dem antigenen Stimulans überempfindlich reagieren.

Die Versuchsergebnisse lassen beide Überlegungen zu. Die erkrankten Patienten antworteten auf die mitogene Stimulation vergleichsweise reduziert, die Spender hoch. Der Vergleich zwischen mitogener und antigenener Aktivierung bzgl. PWM und Zahnplaque zeigt bei den Patienten signifikanten Unterschied an, während die Normalpersonen keinen signifikanten Transformationsunterschied aufweisen (s. Abb. 18, 21, 22).

Die Gegenüberstellung der erkrankten mit der gesunden Untersuchungsgruppe zeigt bezüglich der antigenen Stimulation einen wesentlich höheren Transformationswert bei den Normalpersonen an (s. Abb. 14).

Was aber kann die Ursache für die Hemmung der immunologischen Antwort bei erkrankten Patienten sein? Welcher Natur

muß der Repressor sein, der gleichzeitig hohe immunologische Antworten bei der Stimulation mit homologem Fibroblastenzytoplasma zuläßt, wie sie den Abbildungen 15, 16, 19 und 23 zu entnehmen sind, bei der Aktivierung mit autologer Zahnplaque aber mäßigend bzw. hemmend wirkt?

Es kann argumentiert werden, daß bei Patienten mit Parodontitis marginalis profunda eine höhere Aktivierung der T-Suppressorzellen besteht. Dies würde bedeuten, daß biologisch aktive Zahnbeläge und deren Stoffwechselprodukte auf T-Lymphozytensubpopulationen derart einwirken, daß T-Helferzellen nicht stimuliert werden. Dadurch wird das immunologische Signal ungenügend an die B-Lymphozyten weitergegeben.

Folgt man dieser Argumentation, so bedeutet sie, daß lokale externe Faktoren über T-Zellen hemmend auf die B-Zellantwort einwirken, während sie aber auf fibroblastische Antigene tolerabel oder gar fördernd reagieren. Dieses ist im peripheren Blut nachweisbar.

Dieser Ansatz hat durchaus seine Berechtigung. Die klinische Erfahrung zeigt, daß es bei Patienten mit extremen Zahnbelägen und akuten bis chronischen Gingivitiden nicht notwendigerweise zur Zerstörung des Parodontiums kommen muß. Umgekehrt steht man fast ohnmächtig vor dem Befund extremer generalisierter Knochenresorption mit oder ohne Zahnlockerung, ohne daß nennenswerte Zahnplaque, geschweige hoher Kariesbefall nachweisbar ist. Auch die juvenilen Parodontopathien können nicht immer mit der herkömmlichen Zahnplaque-theorie erklärt werden. So wurde von HARNDT, R. (1969) vermutet, daß bei einem großen Prozentsatz der idiopathischen, juvenilen Parodontopathien eine Autoaggression angenommen werden kann (27).

Faktoren, die T-Lymphozytensubpopulationen beeinflussen, sind der "major histo-compatibility complex" (MHC), Interak-

tionen zwischen sensibilisierten Lymphozyten und Makrophagen sowie Poly-D-Aminosäuren und einige Polysaccharide, die Makrophagen unterlaufen können (69). Dies ist für die Parodontitis marginalis profunda noch nicht untersucht worden.

Der gleiche Autor hat T-Suppressor-Lymphozyten beschrieben, welche eine nicht untergeordnete Rolle in der Immunregulation spielen (69). Diese sind so spezifisch, daß sie die Immunreaktion nur gegen dasjenige Antigen unterdrücken können, welches sie selbst aktiviert hat. MORETTA et al. (1978) beschreiben sogar den Verlust von F_C -Rezeptoren auf B-Lymphozyten, die IgG Immunkomplexen ausgesetzt waren (70). Die Folge dieser Regulationsmechanismen stellt, sofern das geschehen lokal begrenzt bleibt, eine immunologische Toleranz dar, die antigen- und spezisspezifisch ist. Diese Immuntoleranz kann als eine spezielle Form der Immunreaktion beschrieben werden. Vorgänge, die zu dieser Toleranz führen, sind vergleichbar mit denen, die zur Immunität führen.

Ausschlaggebend für die Induktion und den Aufbau dieses Mechanismus ist der Kontakt zwischen Antigen und Lymphozyt. Das Antigen kann in einer tolerogenen Form vorliegen oder so gelagert bzw. verdeckt (coated) sein, daß es von dem Lymphozyt nicht entdeckt oder erkannt wird. In jedem Fall ist die Toleranz antigenspezifisch. Nur die Art der Reaktion zwischen Lymphozytenrezeptoren und Antigen entscheidet, ob eine Immunreaktion ausgelöst wird oder nicht (KRECH, 1976) (50).

Dieser Mechanismus kann bei dem Patientenaufkommen durchaus vorliegen, zumal das Parodont von Zahnplaqueantigenen lokal und permanent penetriert wird. In diesem Zusammenhang muß der Altersunterschied beider Untersuchungsgruppen berücksichtigt werden. Das Durchschnittsalter der Patienten lag mit 36,3 Jahren um 8,9 Jahre über dem der Spender. Ihr Durchschnittsalter betrug 27,4 Jahre.

Diese Immunreaktion erklärt, daß im Versuchsfall bis auf eine Ausnahme (Pat. Nr. 7, s. Tab. 5) alle Patienten auf Zahnbelagsantigen reserviert reagierten, hingegen das Spendergut zweithöchste proliferative Antwort zeigt und damit den Stimulationsbereich von PWM erreicht (s. Abb. 19, 20; Tab. 5).

Die Lymphozytenstimulationen der Patienten 3 und 4 fallen durch äußerste Reserviertheit in allen Versuchsreihen bei niedrigen Spontanplaquewerten auf. Da auch die ihnen zugeordnete Referenzperson (s. Tab. 2) innerhalb der Spendergruppe niedrige Werte aufzeigt, kann eine Fremdeinwirkung, z.B. geringfügige Erythrozyteninsuffizienz, gealtertes fötales Kälberserum, nicht ausgeschlossen werden, da in zwei getrennten Versuchen die Ergebnisse ermittelt wurden (s. Tab. 4).

Die Patientin Nr. 7 zeigt spontane und antigene Plaquewerte, die nur schwerlich einzuordnen sind (s. Tab. 4 u. 5). Beide Untersuchungen sind durch eine Woche getrennt. Auch hier können lokale Einwirkungen nicht ausgeschlossen werden. Es drängt sich aber der Verdacht auf, daß die Patientin zur Zeit der Untersuchung eine Erkrankung unbemerkt durchlaufen oder verschwiegen hat.

7.4 Polyclonale B-Lymphozytenstimulation auf zytoplasmatisches Fibroblastenprotein bei Patienten und Normalpersonen

Die polyclonale Aktivierung peripherer Blutlymphozyten auf zytoplasmatische Fibroblastenbestandteile bei Patienten und Normalpersonen zeigen die Abbildungen 10, 15 und 16. Die zu vergleichende proliferative Antwort mit PWM ist in Abb. 23 und 24, die des Zahnplaqueantigens in Abb. 25 und 26 dargestellt.

Die Abb. 16 zeigt zwar keine graphische Signifikanz an, doch konnte mathematisch belegt werden, daß die Patienten signifikant höher auf Proteinfractionen desintegrierter Fibroblasten reagieren als die Normalpersonen. Dieses stimulative Verhalten steht im Gegensatz zu dem der Zahnplaque. (Abb. 19, 20).

Die Beantwortung der Frage, ob nun das Patientengut höher stimuliert oder die Normalpersonen lediglich schwächer, kann nur durch den Vergleich mit PWM erfolgen. Der graphische Vergleich der mitogenen und antigenen Stimulation bei den Normalpersonen in Abb. 24 zeigt die scharfe Grenze zur mathematischen Signifikanz an (s. 6.8.2). Das Problem der Normalperson E wurde schon unter 7.2 erläutert. Eindeutig nicht signifikant ist der Stimulationsvergleich zwischen erkrankten und gesunden Probanden (s. Abb. 23). Es muß davon ausgegangen werden, daß zytoplasmatische Fibroblastenbestandteile das Patientengut zur Maximalstimulierung führen, denn beide Durchschnittswerte liegen lediglich 867 Plaquewerte voneinander entfernt.

Es ist ferner nachgewiesen worden, daß B-Lymphozyten von Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten signifikant höher auf Fibroblastenprotein reagieren als die der Spender (s. 6.6; Abb. 16). Im Vergleich dazu reagieren die Referenzpersonen bei beiden Antigenstimulationen nahezu signifikant erhöht auf das Zahnplaqueantigen, ein signifikantes bzw. ähnliches Ergebnis im erkrankten Klientel bei gleicher Fragestellung konnte nicht erbracht werden (s. 6.8.3; Abb. 25 u. 26).

Welcher Umstand liegt dem unterschiedlichen Transformationsverhalten zugrunde?

LUCAS et al. (1979) untersuchten L 929 Fibroblasten. Sie zeigten in ihren histochemischen Ergebnissen, daß Endotoxine

den Transport der RNA vom Nucleus zum Zytoplasma hemmen. Mit steigender Konzentration wurde die biologische Zellaktivität unterdrückt (59).

Die Unterdrückung der biologischen Zellfunktion von Fibroblasten kann zur Folge haben, daß die Zelle für das immunologische System erkennbar wird. Die Antigenität kann sich über verschiedene Wege ergeben. So kann über die Beeinflussung der Proteinsynthese für den Organismus fremdes Eiweiß gebildet werden. Veränderungen der Membranstruktur bis zum Zelluntergang mit Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile können das Immunsystem aktivieren und somit hohe Stimulationswerte erklären.

Die im Vorversuch bestimmte Proteinkonzentration von Fibroblasten betrug $50 \mu\text{g}$ pro 10^6 Zellen (s. 6.2). Die Angaben über den Proteingehalt in der Zahnplaque schwanken. BÖSSMANN (1979) gibt einen Gehalt von 35 - 47% der "festen Phase" an (5.) Im Rahmen seiner Plaqueuntersuchungen bestimmte RANNEY (1978) von 16 Patienten den Proteingehalt der feuchten dentalen Plaque (80). Danach sind in 1 mg Feuchtgewicht eines Plaqueentnahmegutes durchschnittlich $31 \mu\text{g}$ Protein enthalten. Der Eiweißgehalt kultivierter dentaler Plaquemikroorganismen wurde von REED et al. (1976) je nach Stamm mit 51 bis $143 \mu\text{g}$ pro ml desintegrierter Kulturstämme angegeben (81).

Die antigen-bedingte Antwort der B-Zellen erkrankter und gesunder Probanden kann nicht allein eine Funktion von $100 \mu\text{g}$ zytoplasmatischen Fibroblastenbestandteilen gegenüber $60 \mu\text{g}$ desintegrierter Zahnplaquebakterien sein. Dies lassen die erhaltenen Ergebnisse nicht zu (s. Abb. 19, 20). Hauptantigene der Mikroorganismen sind nicht ihre zytoplasmatischen Bestandteile, sondern die ihrer Membranen. Hauptantigene gram-negativer Bakterien sind Lipopolysaccharide der Zellwand (Endotoxin), Hauptantigen gram-positiver Mikroorga-

nismen ist die Lipoteichoinsäure aus der Zellmembran (48, 49).

Es wurde bereits erwähnt, daß chronische Erkrankungen des Parodonts mit einer große Anzahl von B-Lymphozyten und einer geringeren Anzahl von T-Lymphozyten einschließlich ihrer Subpopulationen in dem betreffenden Gebiet einhergehen. Tritt ein betreffender T-Lymphozyt mit einem Antigen in Kontakt, so kann er sich zu einem Lymphoblast differenzieren und nach seiner Teilung Lymphokine freisetzen. Diese aktivieren wiederum Makrophagen, welche Prostaglandine freisetzen können (26). Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß nicht alle T-Zellen einer Blastogenese folgen.

Ein Teil der T-Lymphozyten können B-Zellen durch mitogene Faktoren zur Stimulation zwingen, während andere in regulatorische Wechselwirkung mit B-Lymphozyten treten (11).

Diese regulatorische Wechselwirkung wird durch Histokompatibilitätsantigene (HLA) bewirkt (CULLINAN et al., 1980) (13). Das HLA-System kann aber nur dann funktionieren, wenn T- und B-Lymphozyten gleiche HLA-Antigene auf ihren Membranoberflächen tragen. Eine weitere Bedingung ist das Vorhandensein von T-Helferzellen und Makrophagen.

Bei den chronischen parodontalen Erkrankungen sind immer zerstörte Fibroblasten vorhanden, die ihre zytoplasmatischen Bestandteile in das Stroma abgeben. Diese Proteine können nicht nur stimulative Antigenwirkung auf T-Helferzellen erzeugen, sondern auch im Sinne eines HLA-Stimulators wirken. Daher können B-Lymphozyten erkrankter Patienten eine in vitro hohe Bereitschaft zeigen, auf Fibroblastenproteine stimulatив zu reagieren, während Normalpersonen signifikant unempfindlicher reagieren (s. 6.6. u. Abb. 16).

Die zytotoxische Immunreaktion erklärt ein Stimulationsverhalten über die direkte Wechselwirkung mit sezernierten Antikörpern der Immunglobulin G-Klasse.

Antikörper der IgG-Fraktion, IgG₁ bis IgG₃, verbinden sich mit einem auf der Fibroblastenoberfläche gelegenen Antigen. Ist die Bindegewebszelle noch vital, wird sie über die Komplementaktivierung (classical pathway) zerstört. Der zerstörte Fibroblast wird für den Körper als fremd erkannt, so daß sich über Fc-Rezeptoren oder C₃-Komplexreaktionen Antigen-Antikörper-Zellkomplexe bilden können. Diese Immunkomplexe stimulieren unspezifisch B-Lymphozyten zur Transformation. Der Lymphozyt wird zu einer sezernierenden Zelle und gibt unter anderem Lymphokine frei (61, 62, 63, 88).

In solchen tiefen Anteilen geschädigter Parodontien werden gerade Zellaggregate gefunden, die Ähnlichkeit mit Plasmazellen besitzen und über lysosomale Potenz verfügen (85). Diese Zellen, von denen man annimmt, daß sie Subpopulationen von T-Lymphoblasten, Plasmazellen oder Killerzellen sind, richten sich gegen Bindegewebszellen. Sterbende oder abgestorbene Fibroblasten wurden in ihrer Nähe gefunden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß diese Zellen eine antikörperabhängige Fibroblastentoxizität besitzen und für die Bindegewebsdestruktion verantwortlich sind (SCHROEDER und PAGE, 1972) (83, 32).

7.5 Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Arbeit versucht, den zellulären Aspekt und die autoimmune Komponente bei tiefgreifenden Formen marginaler Parodontopathien zu untersuchen.

Die Ergebnisse geben der Vermutung Recht, daß etablierte parodontale Erkrankungen immunpathologische Reaktionen

zeigen. Sie soll aber nicht den Blick dafür verstellen, daß auch andere pathogenetische Faktoren für diese Krankheit typisch sind.

Die HARNDT'sche Trias kann noch heute als gültig angesehen werden, ordnet man die immunologische Komponente den idio-pathischen Faktoren zu.

Die Parodontitis marginalis profunda entwickelt sich primär nicht aufgrund autonomer Reaktionen. Es kann als gesichert gelten, daß ihre Ursache nicht hauptsächlich in dem Problemfeld der Zahnplaque gelagert ist. Als Modell kann eine infektinduzierte - von den Zahnbelägen ausgehende - Autoimmunerkrankung angenommen werden oder von einer Erkrankung gesprochen werden, die im fortgeschrittenen Stadium von autoimmunen Reaktionen mitgeprägt ist.

Die Parodontitis marginalis profunda stellt ein multikausales Geschehen dar. Dieses Geschehen wird durch die Interaktionen der Mikroorganismen mit den Mikro- und Makrozyten sowie der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr einschließlich dem physiologischen Reparations- und Resorptionsvermögen im pathogenetischen Sinne umschrieben. Die tiefgreifenden Formen der marginalen Parodontopathien stellen einen Symptomkomplex, ein parodontales Syndrom dar.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Parodontitis marginalis profunda eine immunologische Komponente besitzt und diese eventuell als pathologisch gewertet werden kann. Dazu wurden zehn erkrankte Personen und fünf Referenzspender in 208 Laborversuchen untersucht. Mit der Methode der umgekehrten hämolytischen Plaque-Technik, auch Protein-A Plaque-Assay genannt, wurden B-Lymphozyten polyclonal stimuliert.

Die Anzahl der Plaques (Lysehöfe) stellt das Maß der Lymphozytenstimulation dar. Als Antigen wurden autologe, desintegrierte Zahnplaque und zytoplasmatische Bestandteile homologer, desintegrierter Fibroblasten verwendet. Als Referenzstimulans diente das künstliche Pokeweed-Mitogen.

Es konnte im Versuch nachgewiesen werden, daß die erkrankten Patienten auf Zahnplaque niedrig, auf zytoplasmatische Fibroblastenbestandteile empfindlicher reagierten.

Das Spendergut antwortete dagegen auf die Stimulation mit Zahnplaque hoch, auf Fibroblastenprotein niedrig. Das Pokeweed-Mitogen zeigte generell höchste stimulative Antwort.

Aus den Ergebnissen wird gefolgert, daß das klinische Bild der Parodontitis marginalis profunda im fortgeschrittenen Stadium empfindlicher durch autologe Substanzen beeinflusst wird als durch supragingivale Zahnbeläge. Es kann somit auch erklärt werden, daß fortgeschrittene Parodontopathien meist ohne akute Gingivitis verlaufen.

Die Interaktionen zwischen der spezifischen zellulären und humoralen Immunabwehr wurden diskutiert.

- 7: BRANDZAEG, P.
KRAUS, F.W.
Immunoglobulin systems of the gingiva.
Odont. T. 73
281 - 293 (1977)
- 8: BRILL, N.
BRÖNNESTAM, R.
Immunelectrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets.
Acta odont. scand. 18,
95 - 100 (1960)
- 9: BROOM, B.C.
De La CONCHA, E.G.
WEBSTER, A.D.B.
JANOSSY, G.J.
ASHERSON, G.L.
Intracellular immunoglobulin production in vitro by lymphocytes from patients with hyogammaglobulinaemia and their effects on normal lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 23,
73 - 77 (1976)
- 10: CARDELLA, C.D.
ALLISON, A.C.
Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolase from macrophages.
Nature (London) 247, 46-48 (1974)
- 11: CHESS, L.,
MAC DERMOTT, R.P.
SONDEL, P.M.
SCHLOSSMAN, S.F.
Isolation and characterization of cells involved in human cellular hypersensitivity.
In: Progress in Immunology II
Eds. BRENT, L. and HOLBOROW, J.
Vol. 3; 125-132 (1974)
Amsterdam: North Holland Publishing Company

- 12: CHURCH, H. The effect of age on the cellular
DOLBY, A.E. immune response to dento-gingival
 plaque extract.
J. periodont. Res. 13,
120 - 126 (1978)
- 13: CULLINAN, M. The distribution of HLA-A and
SACHS, J. B-antigens in patients and their
WOLF, F. families with periodontosis.
SEYMOUR, G.J. J. periodont. Res. 15,
177 - 184 (1980)
- 14: CUNNINGHAM, A.I. Antibody formation studied at
 the single cell level.
Progr. Allergy 17, 5-50 (1973)
- 15: DRESSER, D.W. Assay for antibody production
 cells.
Handbook of experimental Immunology
(Ed. D.M. WEIR)
Vol.2, Chapter 27
Blackwell Scientific Publications,
Oxford 1973
- 16: EBY, W.C. Enumerating immunoglobulin-secret-
CHONG, C.A. ing among peripheral lymphocytes.
DRAY, S. A hemolytic plaque assay for
MOLINARO, G.A. a B-cell function.
J. Immunol. 115, 1700-1703 (1975)

- 17: FAUCI, A.S. Activation of human B-lymphocytes.
 PRATT, K.R.K. I. Direct plaque forming cell assay
 for the measurement of polyclonal
 activation and antigenic
 stimulation of B-lymphocytes.
 J. exp. Med. 144,
 674 - 684 (1976)
- 18: FAUCI, A.S. Activation of B-lymphocytes.
 PRATT, K.R.K. II. Cellular interactions in the
 WHALEN, G. plaque forming cell response of
 human tonsillar and peripheral
 blood B-lymphocytes to poly-
 clonal activation by Pokeweed
 mitogen.
 J. Immunol. 117, 2100 (1976)
- 19: FAUCI, A.S. Polyclonal activation of bone
 PRATT, K.R.K. marrow derived lymphocytes
 from human peripheral blood
 measured by direct plaque
 forming cell assay.
 Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 73,
 3676 - 3696 (1976)
- 20: FAUCI, A.S. Human B-cell function in a
 polyclonal induced plaque
 forming cell system. Cell
 triggering and immunoregulation.
 Immunol. Rev. 45,
 93 - 116 (1979)
- 21: GENCO, R.J. Antibody mediated effects on
 MASHIMO, P.A. the periodontium.
 KRYGIER, G. J. Periodont. 45,
 ELLISON, S.A.. 330 - 337 (1974)

- 22: GINSBURG, W.W. Circulating and mitogen-
FINKELMANN, F.D. induced immunoglobulin secreting
LIPSKY, P.E. cells in human peripheral
 blood: evaluation by a modified
 reverse hemolytic plaque assay.
J. Immunol. 120, 33- 39 (1978)
- 23: GIRARD, J.P. Cell-mediated immunity in an
PAYCHERE, M. ageing population.
CUEVAS, M. Clin. exp. Immunol. 24,
FERNANDES, B. 85 - 91 (1977)
- 24: GOLUB, E.S. A modification of the hemolytic
MISHELL, R.I. plaque assay for use with protein
WEIGLE, W.O. antigens.
DUTTON, R.W. J. Immunol. 100, 133 - 137 (1968)
- 24: GRONOWICZ, E. A plaque assay for all cells
COUTINHO, A. secreting Ig of a given type
MELCHERS, F. or class.
Eur. J. Immunol. 6,
588 - 590 (1976)
- 26: GUPTA, S. What is immune regulation?
GOOD, R.A. Triangel 20, 55 - 58 (1981)
- 27: HARNDT, R. Parodontopathien im Kindesalter
 Dtsch. zahnärztl. Z. 24,
 1062 - 1072 (1969)
- 28: HORTON, J.I. Bone resorbing activity in
RAISZ, I.G. supernatant fluid from cultured
SIMMONS, H.A. human peripheral blood leucocytes.
OPPENHEIM, J.J. Science 177, 793-795 (1972)
MERGENHAGEN, S.E.

- 29: HORTON, J.E. Human lymphoproliferativ reaction
LEIKIN, S. to saliva and dental
OPPENHEIM, J.J. plaque-deposits: An in vitro
correlation with periodontal
disease.
J. Periodont. 43,
522 - 527 (1972)
- 30: HORTON, J.E. Elaboration of lymphotoxin by
OPPENHEIM, J.J. cultured human peripher blood
MERGENHAGEN, S.E. leucocytes stimulated with
dental plaque deposits.
Clin. exp. Immunol. 13
383 - 392 (1973)
- 31: HORTON, J.E. A role for cell mediated im-
OPPENHEIM, J.J. munity in the pathogenesis
MERGENHAGEN, S.E.. of periodontal disease.
J. Periodont. 43,
351-360 (1974)
- 32: HORWITZ, D.A. A role for L-lymphocytes in chronic
inflammation.
In: Perspectives in Inflammation
Future Trends and Developments.
Eds.: WILLOUGHBY, D.A., GIROUD,
J.P. and VELO, G.P.
101 - 111 (1977)
Lancaster: MTP Press Ltd.
- 33: INGRAHAM, J.S. Specific complement dependent
hemolysis of sheep erythrocytes
by antiserum to azo-hapten
groups.
J. infect. Dis. 91, 1378-1379
(1952)

- 34: ISHIKAWA, I. Possible role of lysosomal
CIMUSONI, G. enzymes in the pathogenesis
AHMAD-ZADEH, C. of periodontitis.
A study of cathepsin D in human
gingival fluid.
Arch. oral Biol. 17,
1089 - 1096 (1972)
- 35: IVANYI, L. Stimulation of lymphocyte
LEHNER, T. transformation by bacterial
antigens in patients with
periodontal disease.
Arch. oral Biol. 15,
1089 - 1096 (1970)
- 36: IVANYI, L. Lymphocyte transformation
LEHNER, T. sonicates of dental plaque in
human periodontal disease.
Arch. oral Biol. 16,
1117 - 1121 (1971)
- 37: IVANYI, L. Cell mediated immunity in
WILTON, J.M.A. periodontal disease. Cytotoxi-
LEHNER, T. city, migration, inhibition
and lymphocyte transformation
studies.
Immunology 22,
141 - 145 (1972)
- 38: IVANYI, L. Stimulation of human
LEHNER, T. lymphocytes by B-cell
mitogens.
Clin. exp. Immunol. 18,
347 - 356 (1974)

- 39: JERNE, N.K. Plaque formation by single
NORDIN, A.A. antibody production.
Science 140, 163-405 (1963)
- 40: JERNE, N.K. The agar plaque technic for
NORDIN, A.A. recognizing individual anti-
HENRY, C.C. body forming cells. A manuel
KORNOS, A.M.C. published by Dept. Microbiol.,
School of Medicine, University of
Pittsburgh, Pittsburgh, 1966
- 41: JERNE, N.K. Plaque forming cells:
NORDIN, A.A. methodology and theory.
HENRY, C.C. Transplant. Rev. 18,
FUJI, H. 130 - 191 (1974)
KORNOS, A.M.C.
LEEFKOVITS, I.
- 42: KAHNBERG, K.E. Initial gingivitis induced
LINDHE, J. by topical application of
HELLDEN, L. plaque extract.
J. periodont. Res. 11,
218 - 255 (1976)
- 43: KAPLAN, A.M. Enumeration of cells
FREEMAN, M.J. synthesizing antiprotein
and antibodies by a modified
hemolytic plaque assay.
Proc. Soc. exp. Biol. 127,
574 - 576 (1968)
- 44: KEIGHTLY, R.G. The T-cell dependency of B-cell
COOPER, M.D. differentiation induced by
LAWTON, A.R. Pokeweed mitogen.
J. Immunol. 117, 1538 (1974)

- 45: KIGER, R.D. The significance of lymphocyte
WRIGHT, W.H. transformation response to
CREAMER, H.R. various microbial stimulants.
J. Periodont. 45,
780 - 785 (1974)
- 46: KIRCHNER, H. Polyclonal immunoglobulin
TOSOTO, G., secretion by human B-lymphocytes
BLAESE, R.M., exposed to Epstein-Barr virus
BRODER, S. in vitro.
MAGRATH, I.T. J. Immunol. 122, 1310 - 1313
 (1979)
- 47: KISHIMOTO, S. The immun-response to
TSUYUGUCHI, I. haptten-azo-BSA detected by
YAMAMURA, Y. hemolytic plaque technique.
Int. Arch. Allergy 34,
554 - 555 (1968)
- 48: KNOX, K.W. Antigens, or oral bacteria?
 Advanc. oral Biol. 4,
91 - 130 (1970)
- 49: KNOX, K.W. Immunological properties
WICKEN, A.J. of teichoic acids.
Bact. Rev. 37,
215 - 257 (1973)
- 50: KRECH, U. Immuntoleranz
 In: VORLAENDER, K.O.
Praxis der Immunologie
1. Auflage 86 - 91 (1976)
Georg Thieme Verlag Stuttgart
1976

- 51: LANG, N.P.
SMITH, F.N. Lymphocyte response to T-cell mitogen during experimental gingivitis in man. Infect. Immun. 13, 108 - 113 (1976)
- 52: LANG, N.P.
SMITH, F.N. Lymphocyte blastogenesis to plaque antigens in human periodontal disease. I. Populations of varying severity of disease. J. periodont. Res. 12, 298 - 309 (1977)
- 53: LANGE, D.E..
PLAGMANN, H.C.
EENBOOM, A.
PROMESBERGER, A. Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. Dtsch. zahnärztl. Z. 32, 44 - 47 (1977)
- 54: LINDHE, J.
HELLDEN, L. Neutrophilic chemotactic activity elaborated by dental plaque. J. periodont. Res. 7, 297 - 303 (1972)
- 55: LOCKWOOD, W.R.
ALLISON, F. Electron micrographic studies of phagocytotic cells. I. Morphological changes of the cytoplasm and granules of rabbit granulocytes associated with ingestion of rough Pneumococcus. Brit. J. exp. Path. 44, 593 - 600 (1963)

- 56: LÖE, H.E. Periodontal disease in
SILNESS, J. pregnancy.
I. Prevalence and severity.
Acta odont. scand. 25,
533 - 551 (1963)
- 57: LÖE, H.E. Absence and presence of
HOLM-PEDERSEN, P. fluid from normal and
inflamed gingiva.
Periodontics 3, 171-177 (1965)
- 58: LÖE, H.E. Experimental gingivitis in
THEILADE, E. man.
JENSEN, S.B. J. Periodont. 36,
177 - 185 (1965)
- 59: LUCAS, R.M. Histochemical study of strain
CHEN, S.Y. L-fibroblast exposed to
ALEO, J.J. endotoxin.
J. Periodont. 50, 20-22 (1979)
- 60: LYF, M. Differentiation capacity
LAWTON, A.R. of cultured B-lymphocytes
COOPER, M.D. from immunodeficient
patients.
J. clin. Invest. 52,
3180-3189 (1973)
- 61: MACKLER, B.F. Blastogenesis and lymphokinin
ALTMAN, L.C. synthesis by T- and B-
WAHL, S. lymphocytes from patients
ROSENSTREICH, D.L. with periodontal disease.
OPPENHEIM, J.J. Infect. Immun. 10,
MERGENHAGEN, S.E. 844 - 850 (1974)

- 62: MACKLER, B.F. IgG subclasses in human
WALDROP, T.C. periodontal disease.
SCHUR, P.H. I. Distribution and incidence
ROBERTSON, P.B. of IgG subclass bearing
LEVY, B.M. lymphocytes and plasma
cells.
J. periodont. Res. 13,
109 - 119 (1978)
- 63: MACKLER, B.F. IgG subclasses in human periodon-
FANER, R.M. tal disease. II. Cytophilic and
SCHUR, P.H. membrane IgG subclasses immun-
MAHAN, C.J. globulins.
WRIGHT, T.E. J. periodont. Res. 13,
LEVY, B.M. 433 - 444 (1978)
- 64: MALBERG, K. Die Plaqueteknik und ihre
Modifikationen.
Schriftenreihe für ärztliche
Fortbildung 40,
165 - 182 (1970)
VEB-Verlag: Volk und Gesundheit,
Berlin 1970
- 65: MALBERG, K. Hämolys-Plaqueteknik
SIEGL, E. In: FRIEMEL, H.
Immunologische Arbeitsmethoden
2. Auflage, 133-148 (1980)
Gustav Fischer Verlag
Stuttgart, 1980
- 66: MARTTALA, W.H. Identification of fluorescent
TOTO, P.D. antibodies in periodontitis.
GARGIULO, A.W. J. Periodont. 45,
853 - 861 (1974)

67. MERGENHAGEN, S.E. Immunological reactions and
TEMPEL, T.R. periodontal inflammation.
SNYDERMAN, R. J. dent. Res. 49,
256 - 261 (1970)
- 68: MERGENHAGEN, S.E. Periodontal disease: A model
SNYDERMAN, R. for the study of inflammation.
J. infect. Dis. 123,
676 (1971)
- 69: MILLER, J.F.A.P. Immunoregulation by T-
lymphocytes.
Strategies of Immunoregulation
Academic Press. Inc. London
63 - 74 (1980)
- 70: MORETTA, I. Loss of Fc-receptors for IgG
MINGARI, M.C. from human B-lymphocytes exposed
ROMANZI, C.A. to IgG immune complexes.
Natur (London) 272, 618-620
(1978)
- 71: NISENGARD, R.J. Coating of subgingival bacteria
JARRETT, C. with immunoglobulin and complement.
J. Periodont. 47,
518 - 521 (1976)
- 72: NISENGARD, R.J. The role of immunity in
periodontal disease.
J. Periodont. 48,
505 - 516 (1977)

- 73: PAGE, R.C.
SIMPSON, D.M.
AMMONS, W.F.
SCHECTMAN, L.R.
Host tissue response in chronic periodontal disease. III. clinical, histopathologic and ultra-structural features of advanced disease in a colony-maintained marmoset.
J. periodont. Res. 7,
283 - 296 (1972)
- 74: PAGE, R.C.
DAVIES, P.D.
ALLISON, A.C.
Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture.
Arch. oral Biol. 18,
1481 - 1495 (1973)
- 75: PAGE, R.C.
SCHROEDER, H.E.
Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work.
Lab. Invest. 33,
235 - 249 (1976)
- 76: PATTERS, M.R.
GENCO, R.J.
REED, M.J.
MASHIMO, P.A.
Blastogenic response of human lymphocytes to oral bacterial antigens: Comparison of individuals with periodontal disease to normal and edentulous subjects.
Infect. Immun. 14,
1213 - 1220 (1976)
- 77: PATTERS, M.R.
SEDRANSK, N.
GENCO, R.J.
Lymphoproliferative response during resolution and recurrence of naturally occurring gingivitis.
J. Periodont. 48,
373 - 380 (1977)

- 78: PAYNE, W.A. Histopathologic features of the
PAGE, R.C. initial and early stages of ex-
OGILVIE, A.L. perimental gingivitis in man.
HALL, W.B. J. periodont. Res. 10,
51 - 64 (1975)
- 79: RAMFJORD, S.P. Indices for prevalence and
indidence of periodontal disease.
J. Periodont. 30,
51 - 59 (1959)
- 80: RANNEY, R.R. Immunofluorescent localization
of soluble dental plaque
components in human gingiva
affected by periodontitis.
J. periodont. Res. 13,
99 - 108 (1978)
- 81: REED, M.J. Blastogenic response of human
PATTERS, M.R. lymphocytes to oral bacterial
MASHIMO, P.A. antigens. Characterization of
GENCO, R.J. bacterial sonicates.
LEVINE, M.J. Infect. Immun. 14,
1202 - 1212 (1976)
- 82: RESCH, K. Zelluläre Immunreaktionen
In: VORLAENDER, K.O.
Praxis der Immunologie
1. Auflage, 59 - 71 (1976)
Georg Thieme Verlag Stuttgart
1976

- 83: SCHROEDER, H.E.
PAGE, R.C. Lymphocyte-fibroblast interaction in the pathogenesis of inflammatory gingival disease. *Experimentia* (Basel) 28, 1228 - 1230 (1972)
- 84: SERGE, D.
SERGE, M. Hemolytic plaque formation by mouse spleen cells production antibodies against rabbit immunoglobulin. *J. Immunol.* 99, 867 -875 (1967)
- 85: SEYMOUR, G.J. The immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease in man: Phenotypic characterization in lymphoid cell subpopulations in situ, using enzyme and surface antigen markers. Ph. D. Thesis: University of London (1978)
- 86: SEYMOUR, G.J.
DOCKRELL, H.M.
GREENSPAN, J.S. Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymphnodes, tonsils and periodontal disease. *Clin. exp. Immunol.* 32, 169 - 178 (1978)
- 87: SEYMOUR, G.J.
GREAVES, M.F. The identification of B-cells in human periodontal disease. *J. dent. Res.* 58, C 23, 1226 (1979)

- 88: SEYMOUR, G.H. The phenotype characterization
GREENSPAN, I.S. of lymphocyte subpopulations
 in established human periodontal
 disease.
J. periodont. Res. 14,
39 - 46 (1979)
- 89: SEYMOUR, G.J. Conversion of a stable T-cell
POWELL, R.N. lesion to a progressive B-cell
DAVIES, W.I.R. lesion in the pathogenesis of a
 chronic inflammatory periodontal
 disease: a hypothesis.
J. clin. Periodont. 6,
267 - 277 (1979)
- 90: SEYMOUR, G.J. Identification of cells
GREAVES, M.F. expressing T and p 28,33 (Ia-like)
 antigens in sections of human
 periodontal disease.
J. periodont. Res. 15,
453 - 461 (1980)
- 91: SIEBER, G. Characteristics of immunoglobulin
BOCHERT, G. secretion in man evaluated by a
ENDERS, B. revers hemolytic plaque assay.
RÜHL, H. Blut 41, 81 - 92 (1980)
- 92: SIEGAL, F.P. Suppression of B-cell differen-
SIEGAL, M. tiation by leucocytes from
GOOD, R.A. hypogammaglobulinemic patients.
J. clin. Invest. 58,
109 - 122 (1976)

- 93: SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy.
LÖE, H. II. Correlation between oral
hygiene and periodontal
condition.
Acta odont. scand. 22,
121 - 125 (1964)
- 94: SMITH, S. Polyclonal B-cell activation:
BICK, P.H. Severe periodontal disease in
MILLER, G.A. young adults.
RANNEY, R.R. Clin. Immunol. Immunopath. 16,
RICE, P.L. 354 - 360 (1979)
LALOR, J.H.
TEW, J.G.
- 95: SNYDERMAN, R. Immunological mechanisms of
periodontal tissue destruction.
J. Amer. dent. Ass. 87,
1020 - 1026 (1973)
- 96: TAICHMAN, N.S. Inflammation and tissue
FREEDMAN, H.L. injury.
URIUHARA, T. I. The response to intradermal
injection to human dento-
gingival plaque in normal and
leucopenic rabbits.
Arch. oral Biol. 11,
1385 - 1392 (1966)
- 97: TEMPEL, T.R. Factors from saliva and
SNYDERMAN, R. oral bacteria, chemotactic
HORDAN, H.V. for polymorphonuclear leuco-
MERGENHAGEN, S.E. cytes: their possible role
in gingival inflammation.
J. Periodont. 41,
71 - 79 (1970)

11. ANHANG

Tabellen

Diagramme

Piktogramme

Photographien

Nr.	m/w	Alter	GI	PDI	API	Parodontien
1	m	45	1,9	6	74	30
2	m	43	2,0	6	93	26
3	w	22	1,9	6	80	28
4	w	26	1,7	6	80	30
5	m	24	1,3	5	60	28
6	m	32	0,6	5	30	28
7	w	36	2,0	6	88	27
8	m	42	2,0	6	100	30
9	w	42	1,8	6	77	24
10	w	52	2,0	6	80	28
A	m	26	0,3	0	12	28
B	m	23	0,4	0	10	28
C	m	32	0,3	0	8	30
D	m	27	0,5	0	14	26
E	m	29	0,2	0	7	30

Tabelle 1: Tabellarische Erfassung der Patientenpopulation.

1 und 2 --- A
 3 und 4 --- B
 5 und 6 --- C
 7 und 8 --- D
 9 und 10 --- E

Tabelle 2: Experimentelle Zuordnung der an Parodontitis marginalis profunda erkrankten Patienten zu den Normalpersonen.

Ansatz	Zelldichte	Stimulans	Stim.-Konz.	Stim.-Dosis
Nr.	($10^6/\text{ml}$)		($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{l}/\text{ml}$)
1	1	—	—	—
2	1	PWM	—	5
3	1	Zahnplaque	30	100
4	1	Zahnplaque	60	100
5	1	Zahnplaque	90	100
6	1	Fib.-Prot.	50	100
7	1	Fib.-Prot.	100	100
8	1	Fib.-Prot.	200	100

Tabelle 3: Ansatzschema pro Untersuchungsperson.

atienten/ Spender		A N T I G E N P R Ä P A R A T I O N										M I T O G E N	
		autologe, desint. Plaque pro ml Kultur				homologes Fibrobl.-Prot. pro ml Kultur				(PWM) pro ml Kultur			
		Nihil	30 µg	60 µg	90 µg	50 µg	100 µg	200 µg	5 µl				
1	270 300	1700 1780	2600 3300	1600 1800	1430 1720	2410 2340	1880 2000	5380 7000					
2	80 100	800	1800 3800	1200	1100	2280 2800	800	3720 4720					
3	80 300	720	1260 1500	990	600	1280 1350	300	1650 1280					
4	120 550	1100	1800 750	1320	320	800 900	400	720 2270					
5	220 800	1170	1600 2400	980	2480	4100 3750	1920	1520 2500					
6	300 240	1120 1440	1600 2200	1240 1360	1120 1220	2200 3000	1040 1400	6000 7360					
7	2100 2750	28300 11500	36360 49010	45500	3240 3960	4510 7700	2240 3380	6600 8250					
8	550 400	720	1600 1500	600	1750 1980	1980 3200	1300	2330 2450					
9	520 440	800 980	1200 2700	1080 920	4500 3120	8250 4180	3200 3900	1780 1550					
10	70 120	640	1680 1720	980	2800	3800 3960	3100	6120 8920					
A	1200 1800	5500 8250	8260 10500	11000 9020	650 1136	3640 3600	2860 2200	7200 11020					
B	100 240	1020 690	2720 2800	780 1170	880 400	1600 1600	900 1330	5800 5550					
C	160 200	780	2320 2520	800	990	1920 2300	750	5560 9720					
D	82 1200	1300	3300 3900	2290	1870	2750 3600	3000	7840 6720					
E	160 220	1900 2010	2280 2400	1200 1780	1020 800	1000 1880	900 1100	220 1800					

Tabelle 4: Ergebnisse der polyclonalen Lymphozytenstimulation in aktivierten und nicht aktivierten Zellkulturen.

Patient- Spendergut	Nilhil	Zahnplaque 60 µg/ml	Fibrobl.-Prot. 100 µg/ml	P W M 5 µl/ml
1	285	2950	2376	6190
2	90	2800	2540	4220
3	190	1380	1315	1465
4	335	1275	850	1495
5	510	2000	3925	2010
6	270	1900	2600	6680
7	2425	42685	6105	7425
8	475	1550	2590	2390
9	480	1950	6215	1665
10	95	1700	3880	7520
$\bar{x}$	515	1945	3239	4106
A	1500	9380	3620	9110
B	170	2760	1600	5675
C	180	2420	2110	7640
D	641	3600	2275	7280
E	190	2340	1440	1010
$\bar{x}$	536	4100	2209	6143

Tabelle 5: Mittelwerte der Immunglobulin sezernierenden Zellen mit maximal stimulierenden Konzentrationen.

Desintegrationszeit (sec)	desintegriert (%)		integriert (%)	
	1	2	1	2
1	7	12	93	88
2	19	24	81	76
4	75	80	25	20
8	97	99	3	1
10	99	100	1	0
60	100	100	0	0
120	100	100	0	0
240	100	100	0	0
480	100	100	0	0
600	100	100	0	0

Tabelle 6: Bestimmung der Desintegrationskinetik von Humanfibroblasten in zwei Versuchsreihen.

Standardprotein	Fibroblastenüberstand	Extinktion	
(μ l)	(μ l)	(E $\times$ 10 ⁻³)	

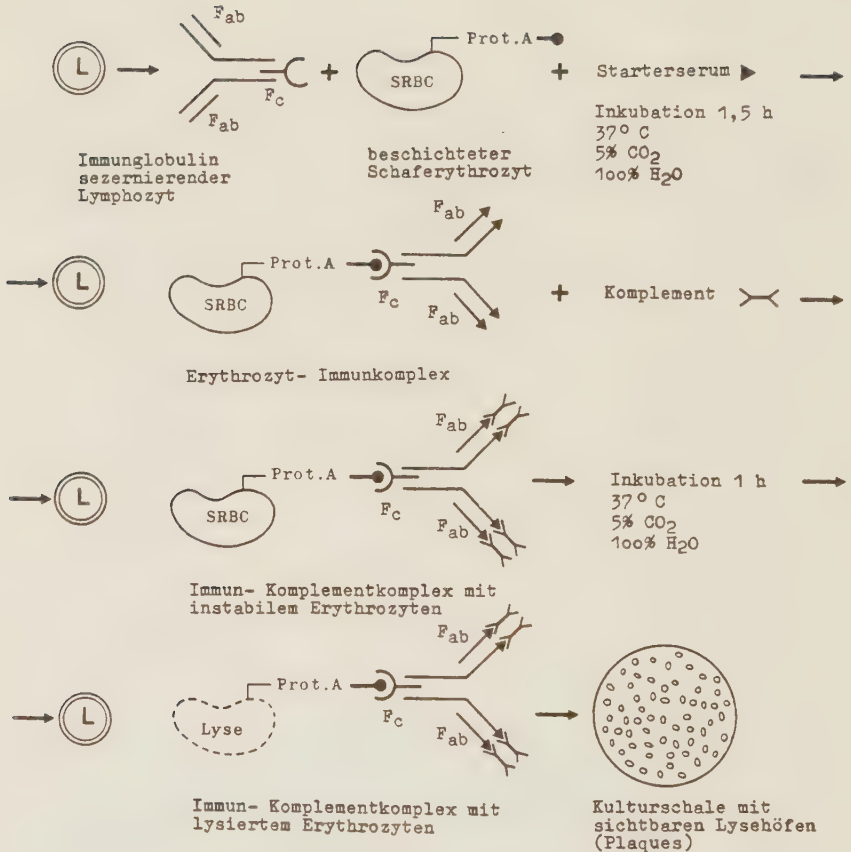
100	-	672	650
80	-	545	521
40	-	270	250
20	-	130	145
10	-	50	75
-	100	930	960
-	50	540	560
-	10	290	275

Tabelle 7: Proteinbestimmung nach dem Bio-Rad-System.

Extinktionswerte des Standardproteins und des zu bestimmenden Fibroblastenüberstandes.

Standardprotein (1) Fibrobl.-Überst. (2) (μl)	Extinktion ($E \times 10^{-2}$)		Proteinkonzentration ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)
(1)			
100	230	236	813,5
80	186	181	650,0
40	90	95	325,5
20	38	49	162,6
10	22	27	81,3
(2)			
100	54	59	205 190
50	28	26	95 90
10	10	12	35 40

Tabelle 8: Proteinbestimmung nach dem Biuret-Verfahren.
Extinktions- und Konzentrationswerte vorgegebener
Volumina eines Standardproteins und eines zu
bestimmenden Fibroblastenüberstandes.



Starterserum = Kaninchenserum

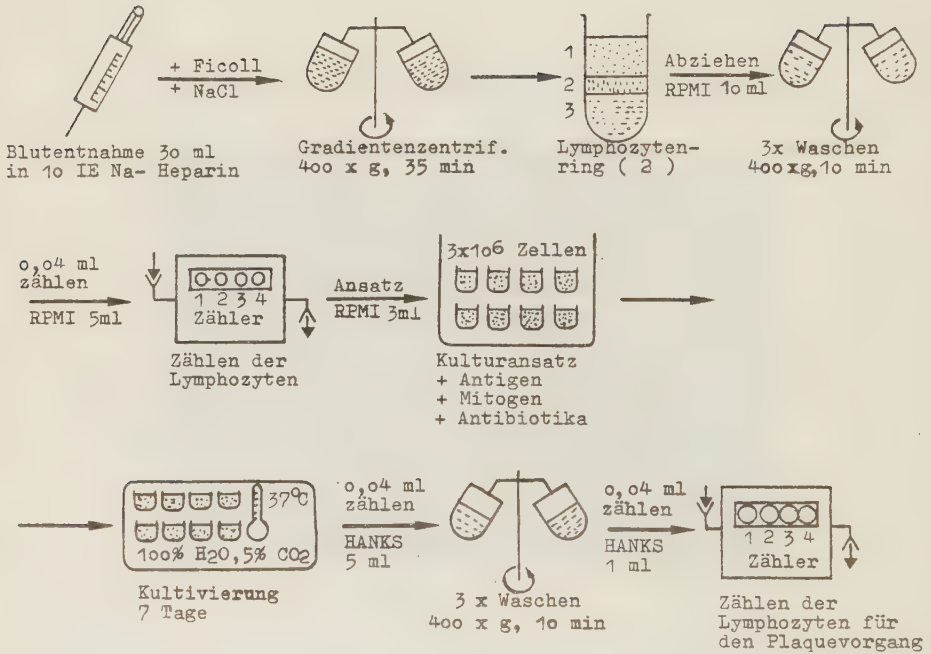
Komplement = Meerschweinenserum

Abb.1: Schematische Darstellung der immunologischen Reaktion des Protein-A Plaque-Assays.



Abb. 2: Plaquebildung einer Immunglobulin sezernierenden Zelle. Im Zentrum des Lysehofes liegt der aktivierte Lymphozyt.

Original-Vergrößerung 1:10



- 1 = Plasma- NaCl- Überstand
 2 = Lymphozyten- Ficoll - Suspension
 3 = Erythrozyten- Granulozyten- Sediment

Abb. 3: Schematische Darstellung der Lymphozytenisolierung und Kultivierung.

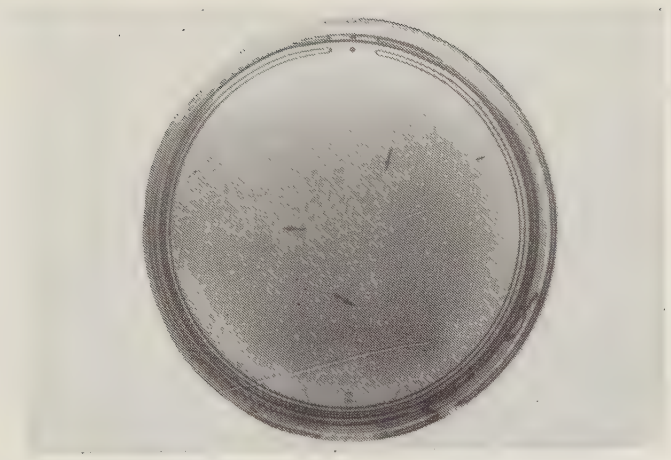


Abb. 4: Plaquebildung von Immunglobulin sezernierenden Lymphozyten in einer Kulturschale.

Die einzelnen Plaques sind in der Durchsicht mit unbewaffnetem Auge zu erkennen und können ausgezählt werden.

Vergrößerung: ca. 1:2



Abb. 5: Desintegrationskinetik einer Fibroblastensuspension in einem MSE 60 W Ultrasonikator.

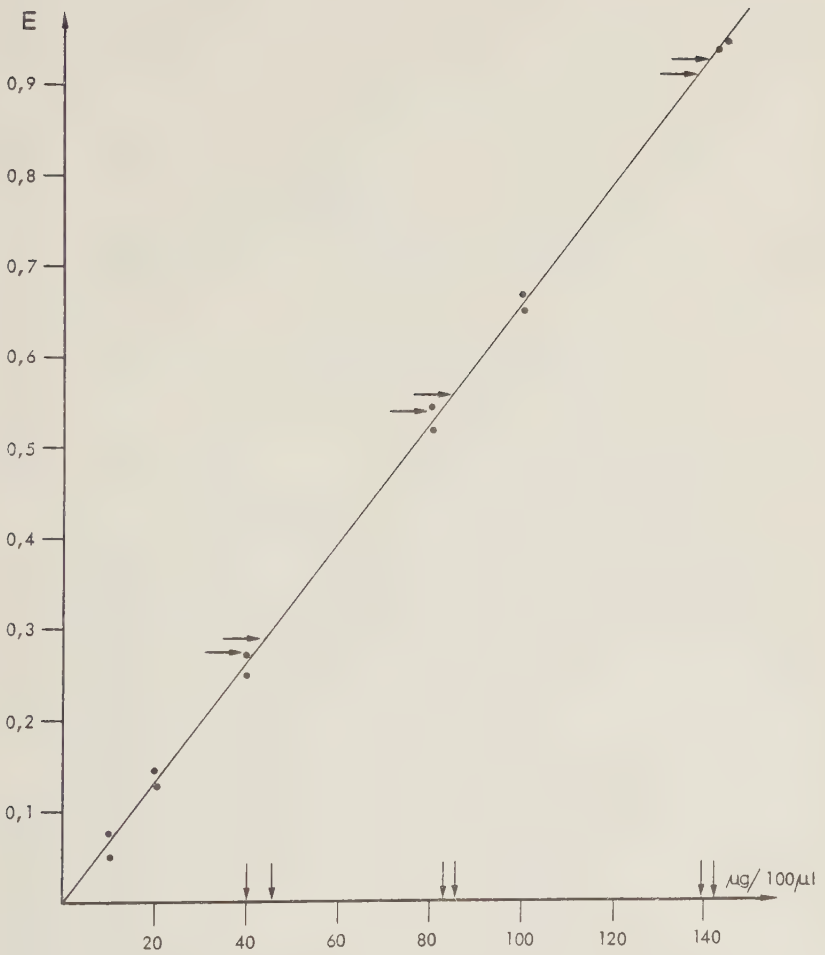


Abb. 6: Proteinbestimmung nach dem Bio-Rad Verfahren.

Über die Eichkurve der Standardlösung ist der Proteingehalt des Fibroblastenüberstandes bestimmt.

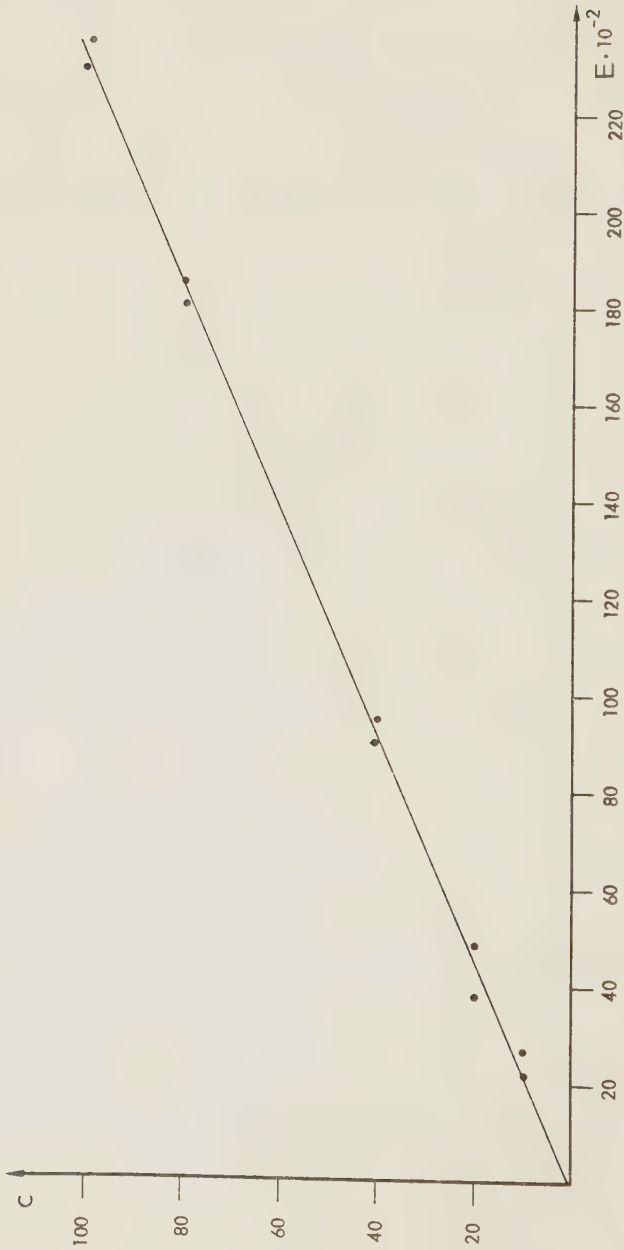


Abb. 7: Bestimmung der Extinktionswerte einer definierten Proteinlösung nach dem Biluret-Verfahren.

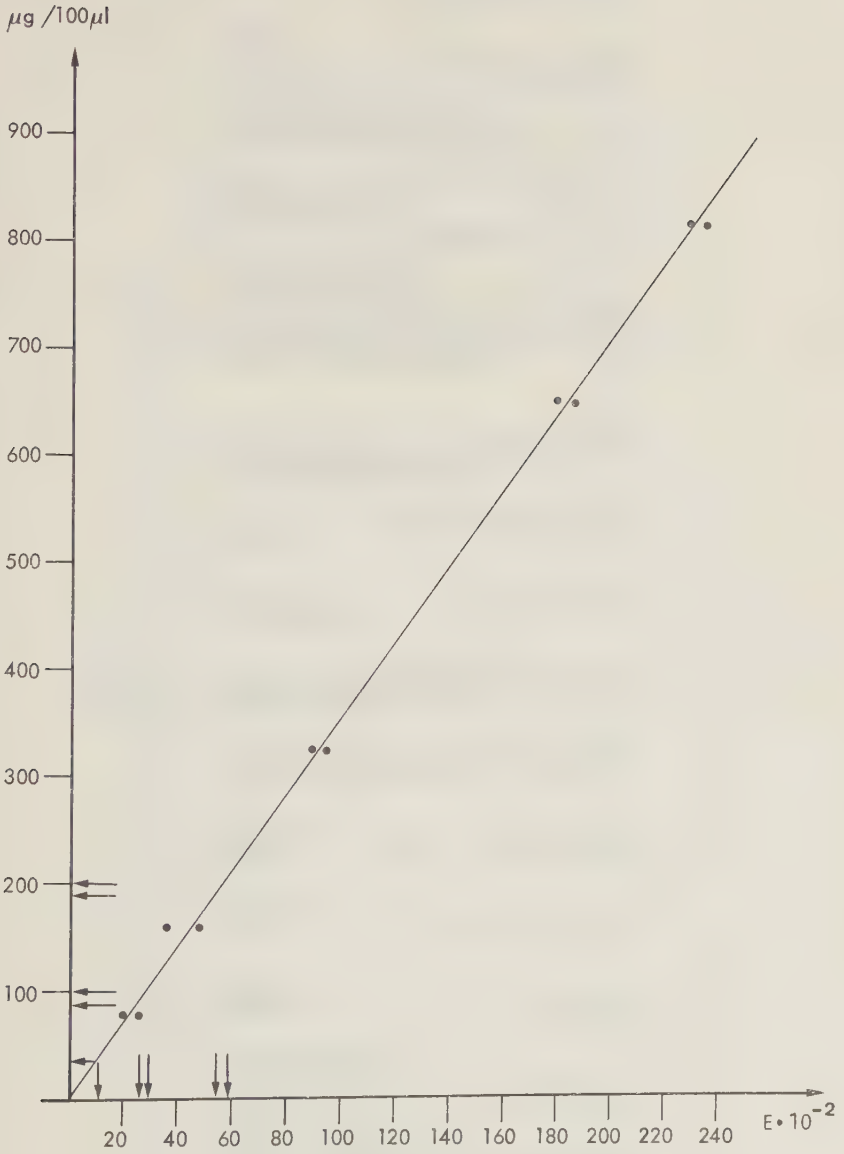


Abb.8: Proteinbestimmung nach dem Biuret- Verfahren.
Über die Eichkurve einer definierten Proteinlösung
wird der Proteingehalt des Fibroblastenüberstandes
bestimmt.

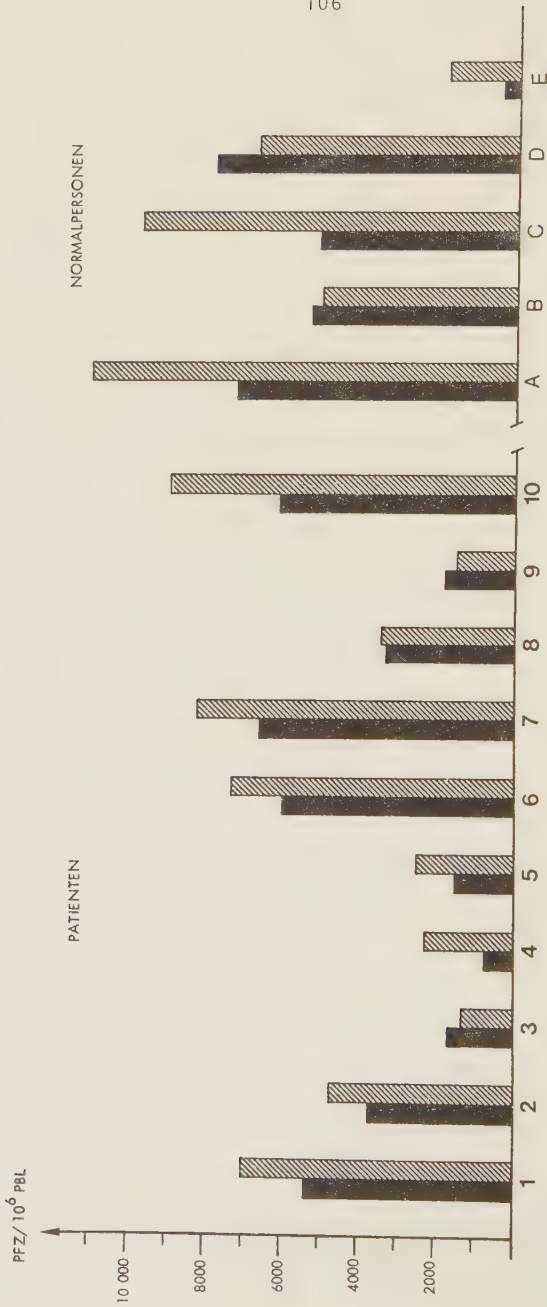


Abb. 9: Pokeweed-Mitogen-induzierte Lymphozytenstimulation aller Untersuchungspersonen. Die optimale Mitogendosis betrug 5 μ l pro ml Kultur und war bekannt. Jede dimere Säulengruppe repräsentiert eine Untersuchungsperson.

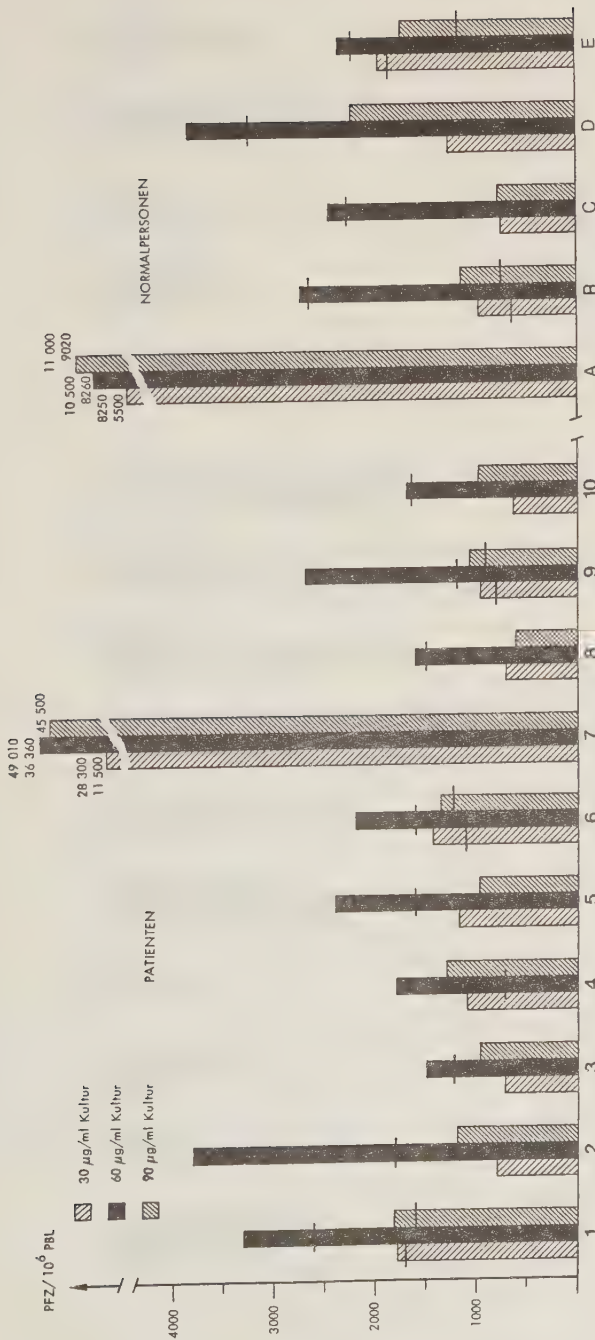


Abb.10: Proliferative B- Lymphozytenstimulation auf drei verschiedene Konzentrationen von autologer, desintegrierter Zahnplaque.

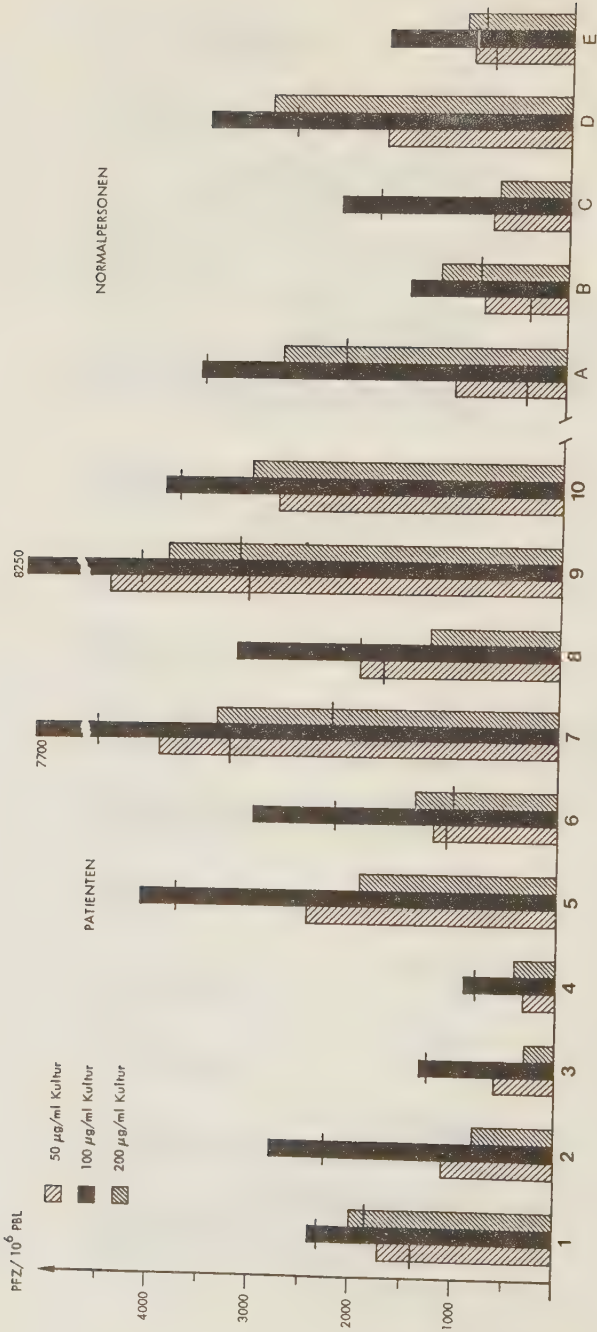


Abb. 11: Proliferative B- Lymphozytenstimulation auf drei verschiedene Konzentrationen von homologem Fibroblastenprotein.

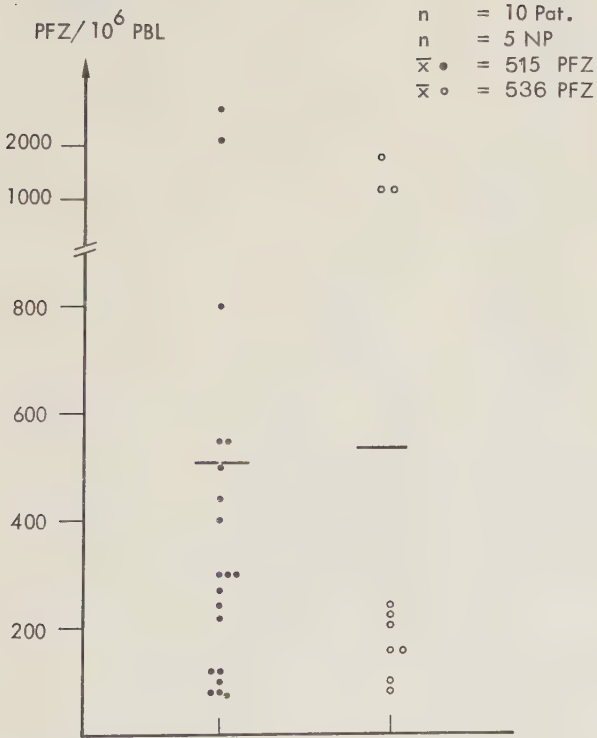


Abb.12: Spontane Plaquebildung bei allen Parod marg. prof. erkrankten Patienten (•) und Normalpersonen (o).

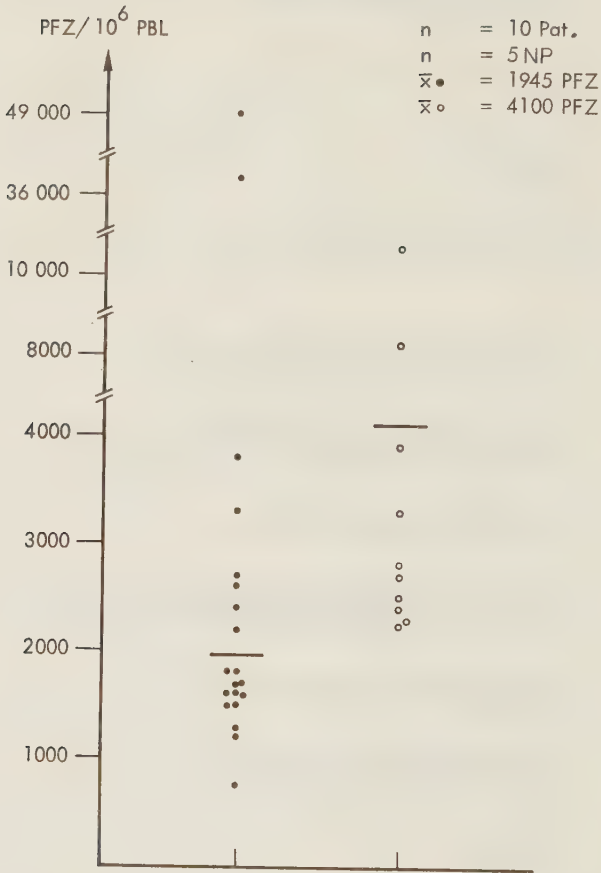


Abb. 13: Polyclonale B-Lymphozytenstimulation bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten (•) und Normalpersonen (◦) mit 60 µg Zahnplaque pro ml Kultur.

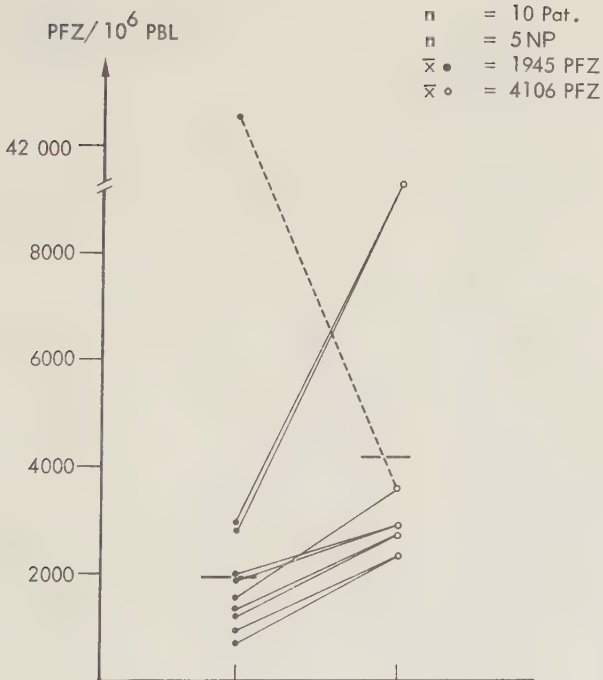


Abb. 14: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen zwei Parod. marg. prof. erkrankten Patienten (•) und der zugewiesenen Normalperson (○). Die Aktivierung erfolgte mit 60 µg autologer Zahnplaque pro ml Kultur.

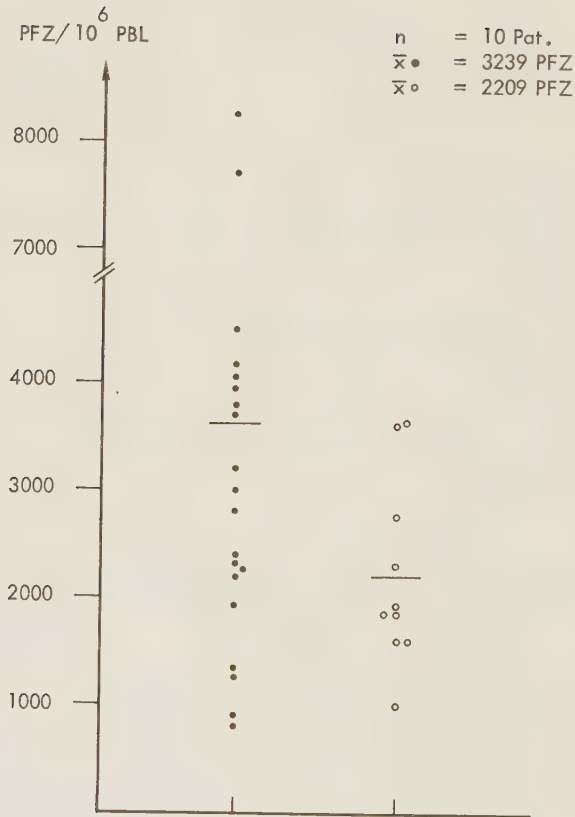


Abb. 15: Polyclonale B-Lymphozytenstimulation bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten (•) und Normalpersonen (°) mit 100 µg homologem Fibroblastenprotein pro ml Kultur.

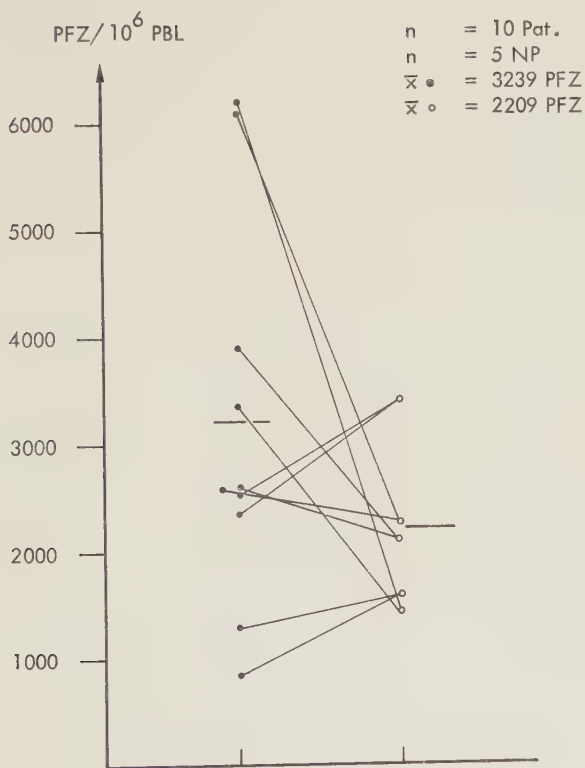


Abb. 16: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen zwei Parod. marg. prof. erkrankten Patienten (•) und der zugewiesenen Normalperson (°). Die Aktivierung erfolgte mit 100 µg Fibroblastenprotein pro ml Kultur.

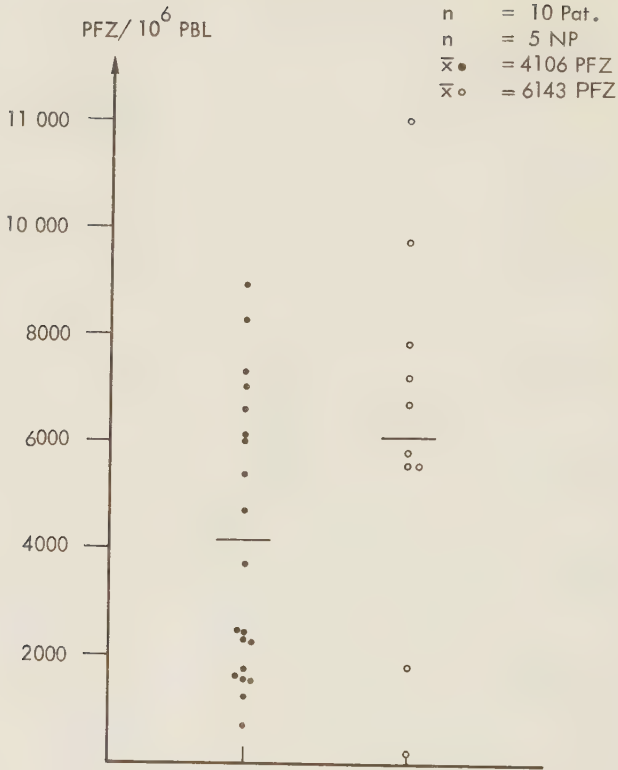


Abb. 17: Pokeweed-Mitogen-induzierte Lymphotytenstimulation bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten (•) und Normalpersonen (°). Die Stimulation erfolgte mit 5 μ l PWM pro ml Kultur.

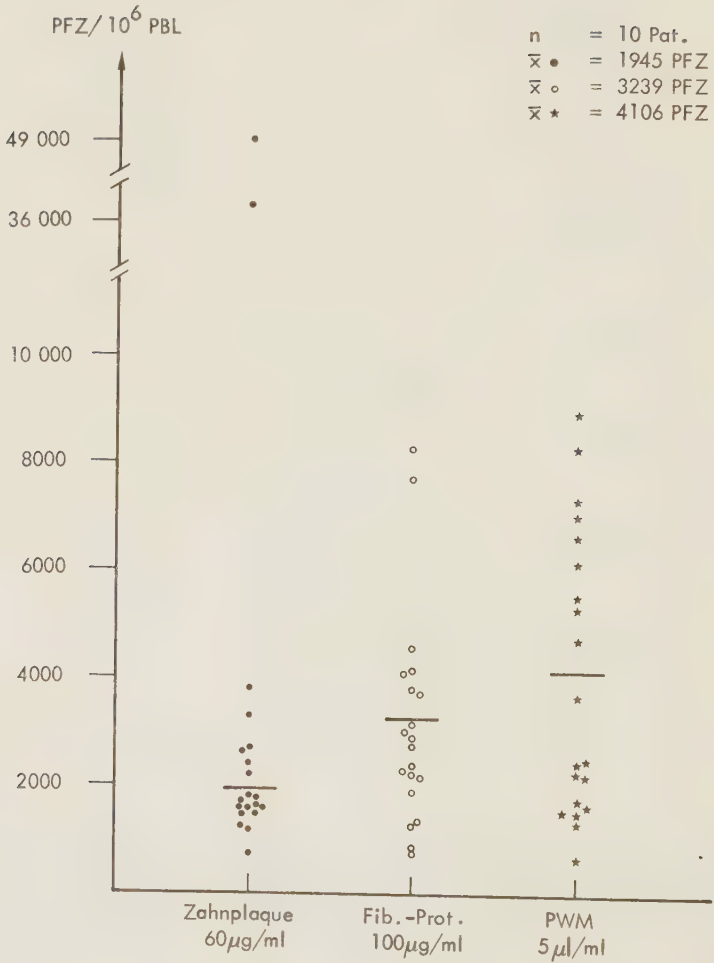


Abb. 19: Polyclonale B-Lymphozytenstimulation aller erkrankten Patienten im Vergleich.

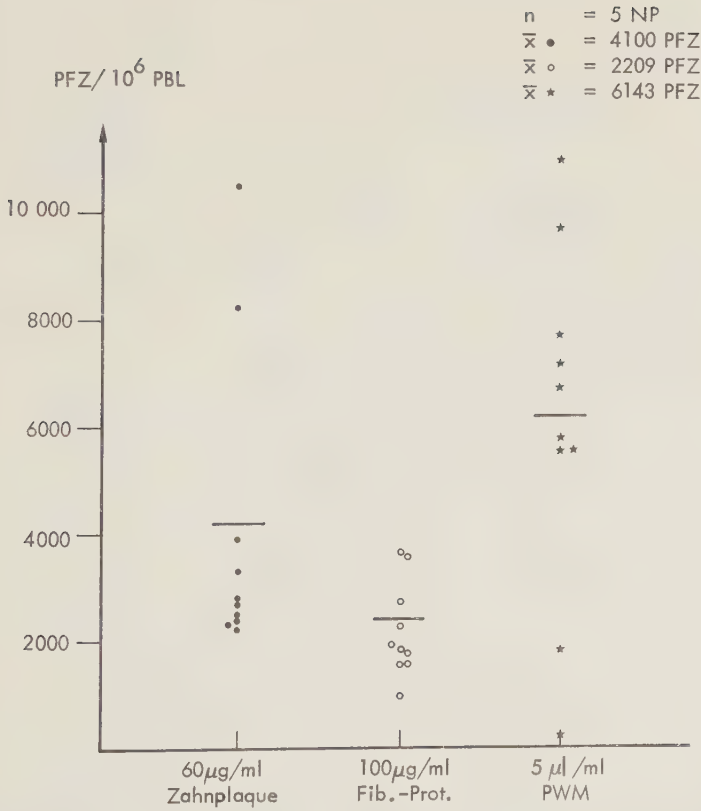


Abb. 20: Polyclonale B-Lymphozytenstimulation aller Normalpersonen im Vergleich.

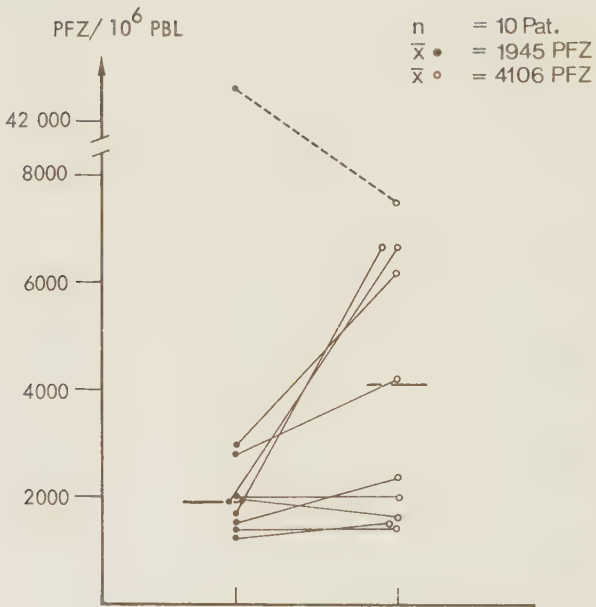


Abb. 21: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 60 µg Zahnplaque (•) und 5 µl PWM (○) bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten.

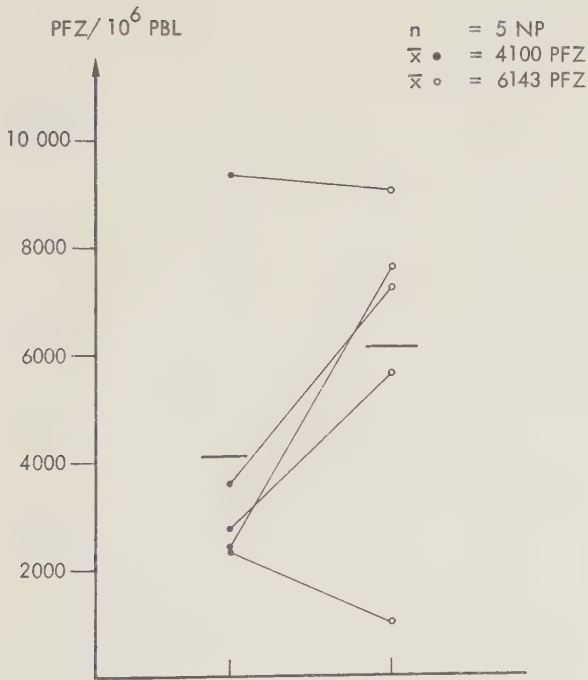


Abb. 22: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 60 µg Zahnplaque (•) und 5 µl PWM (◊) bei allen Normalpersonen.

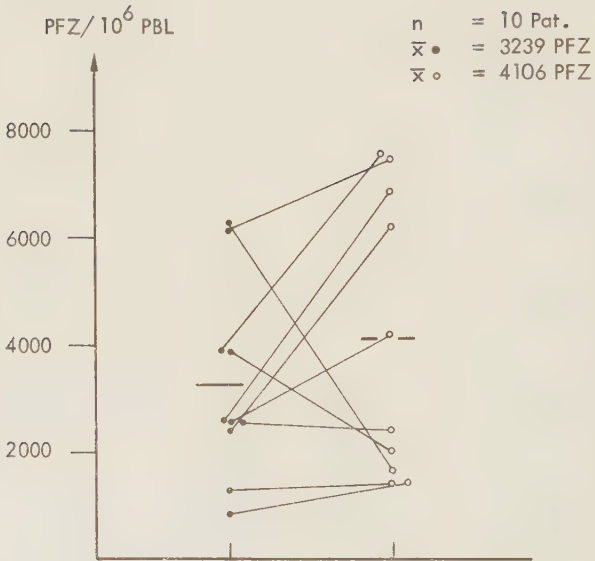


Abb. 23: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 100 µg homologem Fibroblastenprotein (•) und 5 µl PWM (◦) bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten.

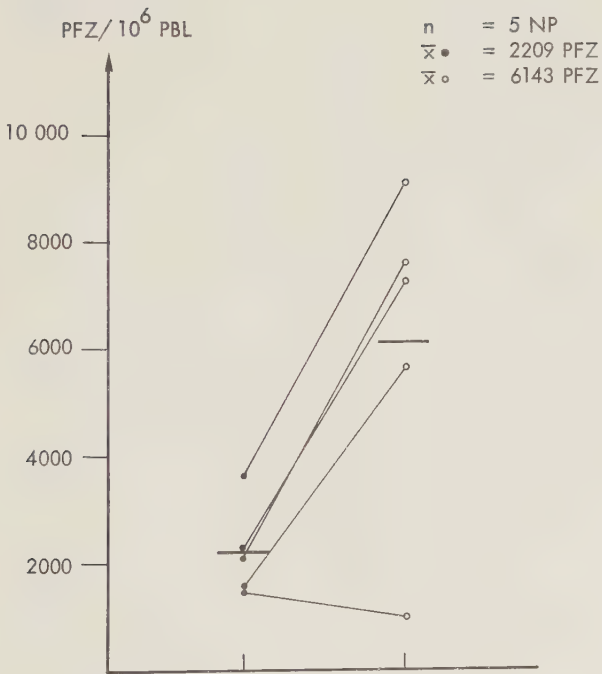


Abb. 24: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 100 μ g homologem Fibroblastenprotein (•) und 5 μ l PWM (◦) bei allen Normalpersonen.

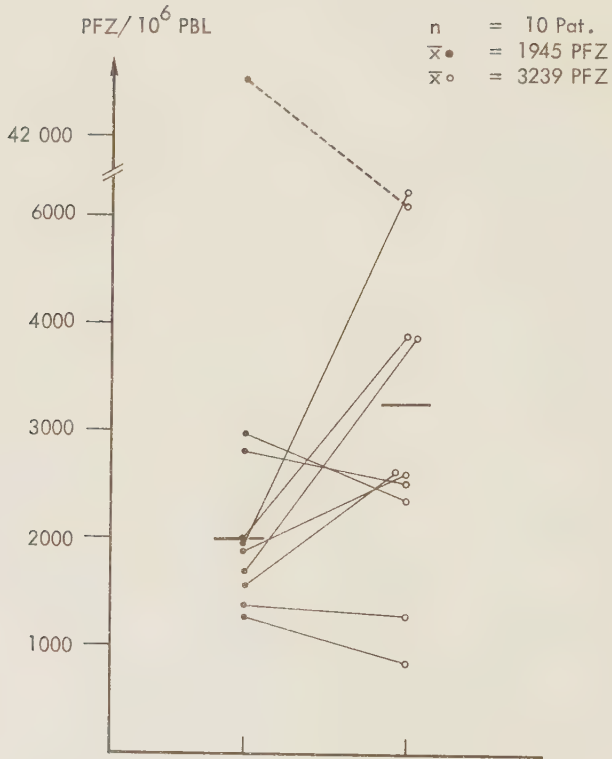


Abb. 25: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 60 µg Zahnplaque (•) und 100 µg homologem Fibroblastenprotein (°) bei allen Parod. marg. prof. erkrankten Patienten.

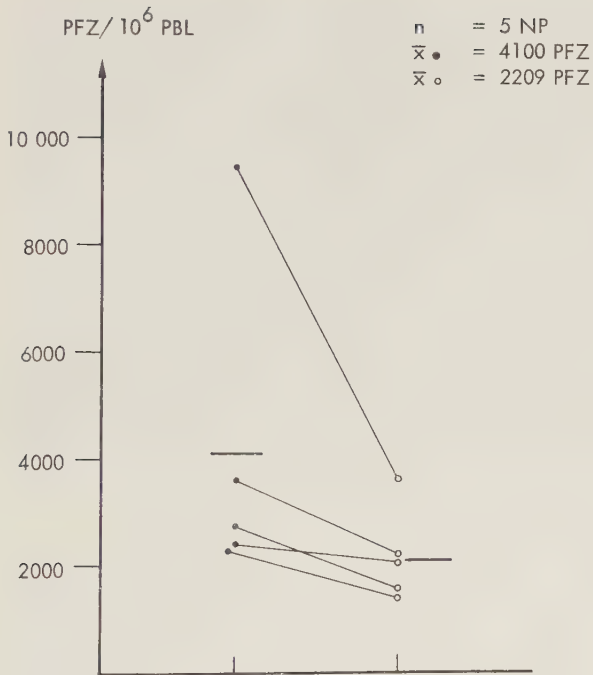


Abb. 26: Vergleich der Lymphozytenstimulation zwischen 60 µg Zahnplaque (•) und 100 µg homologem Fibroblastenprotein (◦) bei allen Normalpersonen.

Die Beschallungszeit von einer Sekunde hinterläßt bei der Fibroblastengruppe an einzelnen Zellen erste Anzeichen der Desintegration.

Während die Nucleoli und die Zellkerne noch erhalten sind, zeigen sich schon einzelne Zellwandperforationen an den sternförmigen Ausläufern.

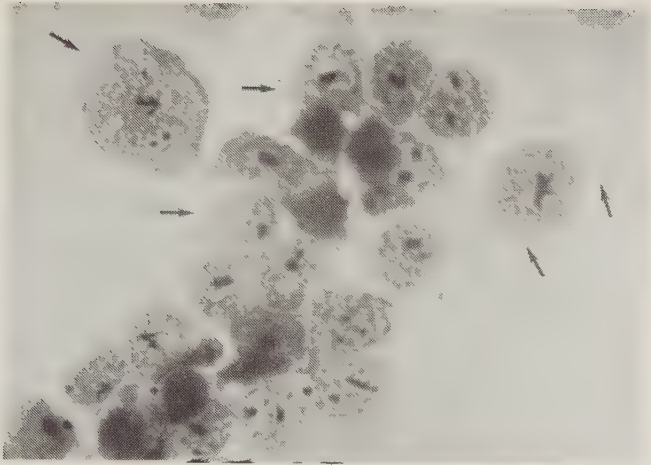


Abb. 27: Desintegrationsstadien einer Fibroblastengruppe
nach einer Beschallungszeit von 1 sec.
Originalvergrößerung: Öl Immersion 1 : 100
Färbung: GIEMSA

Bei einer Beschallungszeit von 2 sec zeigt die Fibroblastengruppe unterschiedliche Zerstörungsgrade. Der rechte Fibroblast ist in Auflösung. Sämtliche Zellstrukturen können nicht mehr voneinander abgegrenzt werden. Die Nucleolusmembran scheint perforiert zu sein, da der Kern sein Plasma verliert ↑.

Die linke untere Zelle hat der Beschallung größeren Widerstand entgegengesetzt. Die Zellwand weist nur eine Perforation auf. Es ist ein deutliches Ausströmen des Zytoplasmas zu erkennen ↑. Zellkern und Zytoplasma sind deutlich voneinander abzugrenzen. Die Kernmembran ist an drei Stellen zerstört ↑. Der Nucleolus erscheint aufgequollen.

Der linke obere Fibroblast zeigt lediglich eine kleine Perforation der Zellmembran ↑. Da er heller gefärbt ist, sind seine Zellstrukturen nicht deutlich zuerkennen.

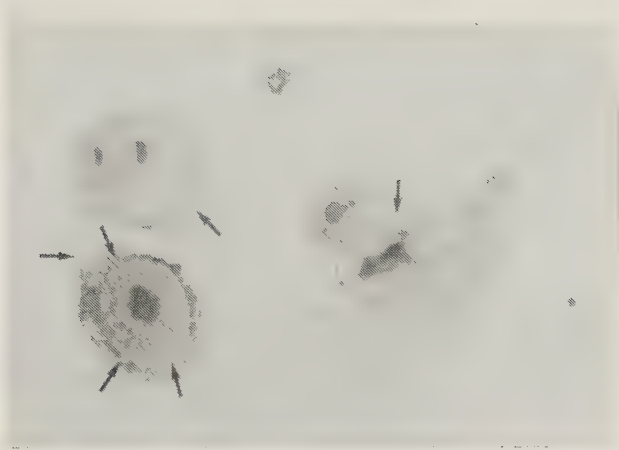


Abb. 28: Desintegrationsstadien einer Fibroblastengruppe
 nach einer Beschallungszeit von 2 sec.
 Originalvergrößerung: Öl Immersion 1 : 100
 Färbung : Methylenblau (LÖFFLER)

Bei einer Beschallungszeit von 4 sec zeigen alle vier Fibroblasten größere Defekte. Die Zellwände und das Zytoplasma sind bereits aufgelöst. Lediglich die Kerne sind noch zu erkennen. Der obere rechte Zellkern ist bereits perforiert und sein Karioplasma ergießt sich nach extrazellulär ↑. Der mittlere rechte Zellkern ist bereits auseinandergerissen ↑, während der Nachbarzellkern noch keine Membranschädigungen aufweist. Lediglich der Nucleolus erscheint aufgebläht. Die starke dunkle Färbung der oberen Anteile des unteren linken Zellkernes deuten auf eine Zerstörung des Nucleolus hin ↑. Der untere Anteil zeigt bereits eine Perforation ↑.

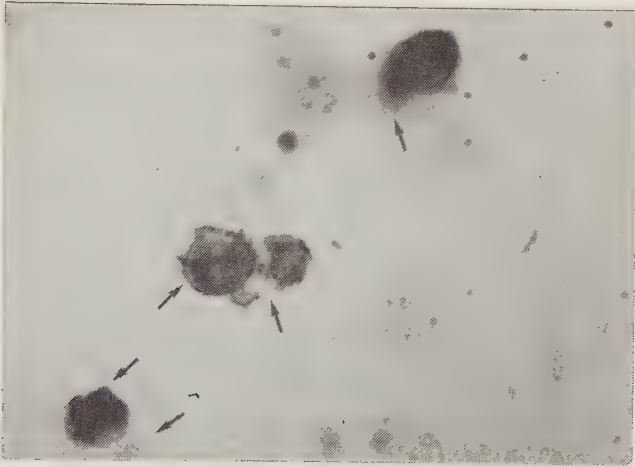


Abb. 29: Desintegrationsstadien einer Fibroblastengruppe
nach 4 sec Beschallungszeit.
Originalvergrößerung: Öl Immersion 1 : 100
Färbung: GIEMSA

Bei der Beschallungszeit von 8 sec werden Zellwand und Kern zerstört. Beide sind vollständig fragmentiert, so daß Zyto- und Karioplasma nach extrazellulär abgegeben werden. Dies ist an den Umrissen zu erkennen. Lediglich um die Nucleoli sind Abgrenzungen sichtbar. Es muß angenommen werden, daß sie vor der Ruptur aufgequollen sind, da sie stark vergrößert erscheinen. Ihr stark gefärbtes Plasma diffundiert bereits nach außen↑ .

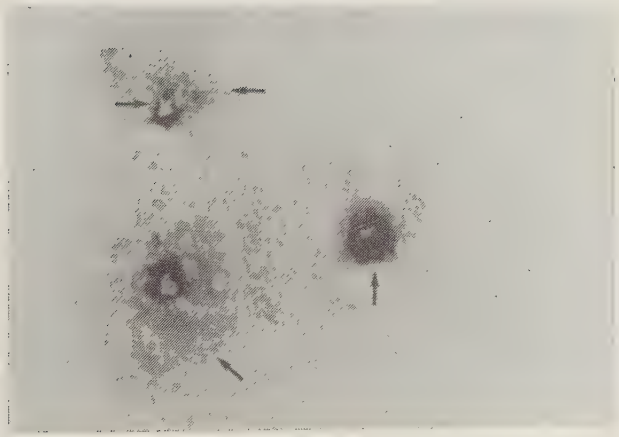


Abb. 30: Desintegrationsstadium einer Fibroblastengruppe
nach 8 sec Beschallungszeit.

Originalvergrößerung: Öl Immersion 1 : 100

Färbung: Methylenblau (LÖFFLER)

Die Beschallungszeit von zehn Sekunden führt zur vollständigen Fragmentierung der Zellen. Es sind keine eindeutigen Zellbegrenzungen bzw. Strukturen zu erkennen. Die Nucleoli haben bereits ihren Inhalt in die Zellen entleert, so daß der Verlauf der dunklen Färbung das Zerreißen der Zellen verdeutlicht ↑ .



Abb. 31: Desintegrationsstadium von zwei Fibroblasten nach einer Beschallungszeit von 10 sec.
 Originalvergrößerung: Öl Immersion 1 : 100
 Färbung: Methylenblau (LÖFFLER)

Herrn Professor Dr. med., Dr. med. dent. Raimund Harndt gilt mein aufrichtiger Dank für die Überlassung des Themas und die vorbildliche Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. dent. Erwin Marggraf danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine hilfsbereite Anleitung, stetige Anregung und konstruktive Kritik.

Dem hämatologischen Labor des Klinikums Steglitz, (Leiter: Professor Dr. med. Horst Brücher) insbesondere Herrn Professor Dr. med. Hartmut Rühl, Herrn Dr. med. Gerhard Sieber und besonders Frau Gudrun Bochart danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes, der labortechnischen Geräte und für die wertvolle Hilfestellung bei den experimentellen Arbeiten. Ohne ihre Mithilfe hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Ferner darf ich Gelegenheit nehmen, Herrn Professor Dr. med. Merker, Herrn Dr. med. Zimmermann, Frau Dr. med. Scharlach und Frau Somogyi für die Isolierung, Züchtung und Überlassung der Humanfibroblasten zu danken.

Die statistische Beratung erfolgte freundlicherweise durch Herrn Professor Dr. med. Fuchs, Leiter der Abteilung für Medizinische Statistik und Dokumentation der Freien Universität Berlin, dem ich hiermit meinen Dank ausspreche.

Allen weiteren Mitarbeitern, die indirekt an dieser Arbeit mitwirkten, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wolfgang Kopp
geboren am: 3. Oktober 1949
Geburtsort: Herborn im Dillkreis
Eltern: ev. Eheleute Günter und Hilde Kopp
geb. Rupp

Schulbildung

1956 - 1961 Besuch der Volksschule Herborn
1961 - 1966 Absolvent der Realschule Herborn
1972 - 1975 Besuch der Volkshochschule Schöneberg,
Berlin Schöneberg
Abschluß: allgemeine Hochschulreife
1974 - 1975 Student der Meteorologie an der Freien
Universität Berlin mit kleiner Matrikel

Berufsausbildung

1966 - 1971 Ausbildung zum staatl. geprüften Trickkamera-
mann an berufsbildenden Einrichtungen in Dill-
lenburg (Dillkreis) und Berlin
1971 - 1973 Berufsausübung in zwei Filmproduktionen
29.3.1976 Studium der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an
der Freien Universität Berlin

10.3.1977 Abschluß der naturwissenschaftlichen
Vorprüfung
9.10.1978 Abschluß der zahnärztlichen Vorprüfung
16.9.1981 Staatsexamen
Seit
1.10.1981: wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung
für konservierende Zahnheilkunde und Parodon-
tologie der Klinik und Poliklinik für Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde der Freien Univer-
sität Berlin



